

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR - INGÉNIEUR

par

Zarif EL OUCH

SUJET :

Contribution à l'étude des exsudats racinaires
de différentes espèces de **Lycopersicon** et de leur influence sur
le comportement **in vitro** de **Pyrenochaeta lycopersici**
Gerlach et Schneider

Soutenue publiquement le 9 Juillet 1974 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. F. MANGENOT	Président
J. GARNIER	} Examinateurs
J. DEXHEIMER	
J. LOUVET	

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR - INGÉNIEUR

par

Zarif EL OUCH

SUJET :

Contribution à l'étude des exsudats racinaires
de différentes espèces de **Lycopersicon** et de leur influence sur
le comportement **in vitro** de **Pyrenochaeta lycopersici**
Gerlach et Schneider

Soutenue publiquement le 9 Juillet 1974 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. F. MANGENOT	Président
J. GARNIER	} Examinateurs
J. DEXHEIMER	
J. LOUVET	



A mes parents

A mes frères et soeurs

en témoignage de ma reconnaissance

Le présent travail a été effectué au
Laboratoire de Botanique et de Microbiologie de
l'Université de NANCY I.

Je tiens à exprimer à Monsieur le
Professeur MANGENOT, qui a bien voulu m'accueillir
dans son service, ma profonde reconnaissance pour
avoir grandement facilité ma tâche, non seulement
en me prodiguant, au cours de nombreux entretiens,
ses conseils mais encore pour avoir d'une manière si
délicate, grâce à son expérience et son remarquable
esprit d'organisation, aplani les difficultés sur-
venues au cours de mon travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Mon-
sieur le Professeur GARNIER pour l'attention qu'il
a bien voulu porter à ce mémoire et je suis très
honoré de le voir compter parmi les membres de ce
jury.

Monsieur le Professeur DEXHEIMER m'a
fait l'honneur de s'intéresser à mon travail et de
le juger, je le remercie très vivement.

Monsieur LOUVET, Directeur de la station
de recherches sur la flore pathogène dans le sol, à
Dijon, a accepté avec beaucoup d'amabilité de faire
partie de mon jury. Sensible à cet honneur, je le prie
de bien vouloir agréer l'expression de ma profonde
reconnaissance.

Que tous ceux qui ont contribué directe-
ment ou indirectement à la réalisation de cette thèse
trouvent ici mes plus sincères remerciements.

SOMMAIRE

Je remercie le Ministère de l'Enseignement supérieur de la République ARABE SYRIENNE qui, avec l'aide matérielle apportée, m'a permis de préparer cette thèse.

INTRODUCTION	8
PREMIERE PARTIE	
CHAPITRE I - LA SUBSTITUTION VASculaire	9
INTRODUCTION	9
I MATERIEL ET METHODES	10
A - Préparation des piloniers	10
B - Soins des lésions	11
II RESULTATS	11
III DISCUSSION	12
DEUXIEME PARTIE	
CHAPITRE II - LES REPERES VASculaires	13
I OBTENTION DES EXCOPIES VASculaires	14
A - Méthode de culture	14
1) Traitement préalable du sable	14
2) Méthode de culture	14
3) Germination des semences	15
4) Culture aseptique dans des flacons d'Enochowicz	15
B - Conditions de culture	16

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	3
<u>PREMIERE PARTIE</u>	
<u>ETUDE DE LA SENSIBILITE VARIETALE -</u>	8
<u>INTRODUCTION</u>	9
<u>I MATERIEL ET METHODES -</u>	10
A - Préparation des piluliers	10
B - Etude des lésions	11
<u>II RESULTATS</u>	11
<u>III DISCUSSION -</u>	12
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	
<u>ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXSUDATS RACINAIRES</u>	13
<u>I OBTENTION DES EXSUDATS RACINAIRES</u>	14
A - Méthode de culture	14
1) Traitement préalable du sable	14
2) Milieu de culture	14
3) Germination des semences	15
4) Culture aseptique dans des fioles d'Erlenmeyer	16
B - Conditions de culture	16

1) Lumière	17
2) Température	17
3) Durée de la culture	17
4) Support et milieu de culture	18
 C - Récolte des exsudats stériles	 18
D - Contrôle de la stérilité	18
E - Concentration des exsudats	19
 II <u>CHROMATOGRAPHIE</u>	 19
 A - Chromatographie échangeuse d'ions	 19
1) Chromatographie des acides aminés	19
2) Chromatographie des sucres	20
B - Chromatographie des sucres sur couche mince de cellulose	21
1) Matériel et Méthodes	21
a) préparation de la phase stationnaire	21
b) dépôts	21
c) solvants et temps de migration	21
d) révélation	21
2) Résultats	22
3) Discussion	23
 C - Analyse des acides aminés	 24
1) Chromatographie sur couche mince de cellulose	24
2) Analyse au Technicon des acides aminés	24
a) matériel et méthodes	24
b) résultats	25
c) discussion	27

D - Chromatographie des acides phénoliques sur couche mince de gel de silice (Kieselgel)	28
1) Matériel et Méthodes	28
a) extraction	28
b) hydrolyse acide de la phase aqueuse	29
c) préparation des plaques de gel de silice (Kieselgel)	29
d) dépôts	29
e) solvants et migration	29
f) révélation	31
g) détermination quantitative	32
2) Résultats	32
3) Discussion	36

TROISIEME PARTIE

<u>EFFET DES EXUDATS ET DE LEURS CONSTITUANTS SUR LA GERMINATION DES CHLAMYDOSPORES, LA CROISSANCE MYCELIENNE ET LES ACTIVITES RESPIRATOIRES DE CELUI-CI -</u>	38
--	----

I <u>MATERIEL ET METHODES</u>	39
A - Isolement de la souche étudiée	39
B - Germination des chlamydospores	39
1) Préparation de la suspension mycélienne	39
2) Méthode d'étude de la germination	39
C - Etude de la croissance	40
1) Choix du milieu de culture	40
2) Croissance linéaire	41
3) Production de mycélium	42

D - Respirométrie	42
II <u>RESULTATS</u>	43
A - Effet des exsudats sur la germination	44
B - Effet des acides phénols	46
1) Sur la germination	46
2) Sur la croissance	46
3) Sur la respiration	48
C - Effet de la fraction cationique sur la germination des chlamydospores	54
D - Influence de la teneur en N aminé sur la croissance de	56
E - Influence des acides aminés	58
1) Recherche des constituants stimulants	59
a) influence sur la germination de <i>P. lycopersici</i>	59
b) influence sur la croissance de <i>P. lycopersici</i>	62
c) influence de certains acides aminés seuls ou en combinaison sur la croissance pondérale de <i>P. lycopersici</i> .	63
III <u>DISCUSSION</u>	64
A- Effet des exsudats	64
B- Effet des acides phénols	65
C- Fraction cationique	67
D- Effet des acides aminés	68
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	70
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

I N T R O D U C T I O N

On admet généralement que les substances exsudées par les racines des plantes fournissent une importante source d'énergie pour les micro-organismes au voisinage de ces racines (Rhizosphère).

L'exsudation racinaire au niveau des racines des plantes supérieures a été pressentie dès l'antiquité et décrite depuis plus de 150 ans : pour la première fois, MACAIRE (1833, cité par MOHADDES, 1971) expérimenta et conclut que la plupart des végétaux exsudent par leurs racines des substances qui favorisent leur propre développement.

Plus tard, en 1838 puis en 1860, LIEBIG et SACHS (cités par MOHADDES, 1971) mettaient en évidence l'altération du marbre par les racines de Maïs. Les substances exsudées sont très variées, on peut même y trouver des antibiotiques (STIVEN, 1952).

Des racines de jeunes plants de *Pinus strobus* cultivées en conditions aseptiques en présence de $^{14}\text{CO}_2$, laissent exsuder en une semaine plus de 35 substances radio-actives différentes : sucres, acides aminés et acides organiques (SLANKIS et coll. 1964).

Ces trois classes de corps organiques ont été retrouvées dans les exsudats de très nombreuses plantes et en plus, des enzymes, vitamines, ions minéraux, composés phénoliques et des substances plus spécifiques ont été aussi identifiées (KATZNELSON et coll. 1954 ; PARKINSON, 1955 ; ROVIRA, 1956 ; LAWRENCE et coll. 1963 ; BUXTON, 1962 ; HUS-SAIN et coll. 1963 ; VANCURA, 1964 ; NOURELDIN et coll. 1964 ; VANCURA et coll. 1965 ; DJAVADI, 1968 ; PAQUIN, 1968 ; AGNI-HOTRI et coll. 1968 ; VANCURA et coll. 1969 ; BOOTH, 1969 et YUNG CHANG-HO, 1970).

La composition chimique des exsudats racinaires et leurs relations avec les micro-organismes de la rhizosphère ont été étudiées pour différentes espèces végétales (BARTON, 1957 ; KRAFT, 1967 et 1970).

Certaines substances chimiques sont essentielles à la croissance du micro-organisme étudié alors que d'autres peuvent en favoriser ou en empêcher le développement (SOKOLOVA et coll., 1960 ; KURTZ et coll., 1964 ; SINGH, 1964 ; KUC, 1966 ; AGNIHOTRI et coll., 1967 et THIND et coll., 1968).

Il semble que les exsudats racinaires sont nécessaires à certains agents pathogènes pour leur permettre de pénétrer dans les racines et de survivre en compétition avec les autres représentants de la microflore rhizosphérique (BUXTON, 1960). *Pyrenochaeta lycopersici* montre des réactions différentes vis-à-vis des différentes variétés de Tomate (BESRI, 1970).

Ces considérations nous ont amené à déterminer la composition des exsudats en sucres, en acides aminés et en acides phénols avec l'espoir d'établir une corrélation entre la présence ou la quantité de l'une ou de l'autre de ces substances et la résistance ou la susceptibilité des différentes espèces de Tomate à *P. lycopersici*, agent du "Corky root", maladie liégeuse des racines de Tomate.

D O N N E E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

Les sources nutritionnelles des micro-organismes dans un sol non influencé par les systèmes racinaires des plantes sont constituées en grande partie de résidus végétaux à divers degrés de décomposition.

Dans la rhizosphère, ces micro-organismes reçoivent leur nourriture des exsudats des racines qui sont principalement des substances à bas poids moléculaire (VANCURA, 1964). Beaucoup de recherches ont montré une plus grande activité microbienne dans la rhizosphère de certaines plantes que dans la partie située un peu plus loin des racines (SINGH, 1964 et NEAL et coll. 1968). Cette activité est due aux éléments exsudés par les racines de plantes (BARTON, 1957 ; YOUSSEF et coll. 1969 et VANEGERAAT, 1971).

L'abondance microbienne sur la surface des racines et à leur proximité est un effet "rhizosphérique" ; il y a des différences dans la composition microbienne soit quantitative soit qualitative sur la surface des racines dans la rhizosphère et dans le sol libre, ce qui montre l'effet des exsudats racinaires (HARLEY, 1959 et MACURA, 1971).

L'activité microbienne dans la rhizosphère est très importante pour les plantes ; les micro-organismes sont des agents actifs dans le cycle de nutrition car par leurs activités, ils préparent un environnement convenable pour les plantes ; ils sont responsables de la minéralisation du phosphore, du soufre et du manganèse (MACURA, 1971) ; par contre et dans certaines conditions, les micro-organismes interviennent pour utiliser les sels minéraux ce qui entraîne un manque de ces éléments pour les plantes (carences) ; par exemple : carence en manganèse chez l'Avoine (TIMONIN, 1946 cité par PARK, 1963).

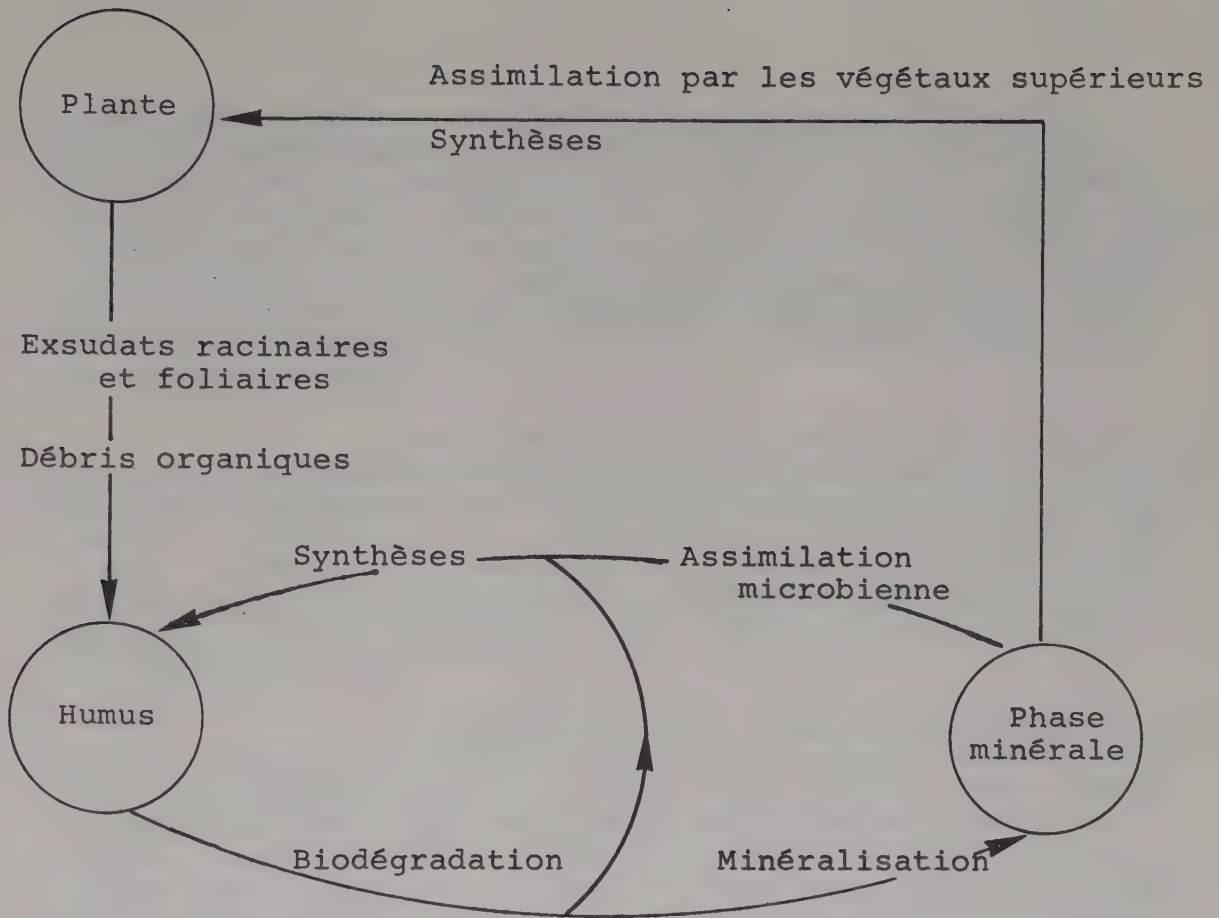


Diagramme présentant les relations alimentaires entre les plantes et les micro-organismes de la rhizosphère (d'après MACURA, 1971)

Les exsudats racinaires ne sont pas produits uniformément tout le long de la racine, ils sont présents en quantité maximale dans les régions jeunes où il n'existe pas de liège superficiel et où l'activité enzymatique est importante. KATZNELSON (1954) a montré que la plante exsude surtout vers l'extrémité de la racine à partir des poils absorbants et des cellules épidermiques ; dans les régions protégées par le liège, l'exsudation n'est importante qu'au niveau des blessures et aux point d'émergence des radicelles déchirant le liège.

VANEGERAAT (1971) a montré que l'exsudation des substances "ninhydrine-positives" se fait directement en arrière du sommet des racines ; des quantités relativement

importantes de ces substances sont exsudées quand les racines latérales sortent des racines principales. La thréonine et l'asparagine sont exsudées par les extrémités des racines tandis que leucine, valine, acide glutamique et phénylalanine se trouvent en grande quantité dans la région des poils absorbants. Ces résultats permettraient d'expliquer la croissance des différents micro-organismes dans les différentes régions des racines (FRENZEL, 1960, cité par ROVIRA, 1965).

Dans les conditions naturelles, la concentration des éléments nutritifs autour des racines est difficile à déterminer et, de plus, l'exsudation est affectée par les conditions de l'environnement comme l'humidité du sol, la lumière, la température, l'aération et surtout le métabolisme de la microflore (ROVIRA 1959 et 1969; KRAFT et coll., 1967 ; MINSHALL, 1968 ; BUSHAN et coll., 1971 et REDINGTON et coll., 1971).

La libération des substances chimiques par les racines des plantes et leurs effets sur l'augmentation de l'activité microbienne autour des racines (effet rhizosphérique) sont très importants en biologie du sol. Certaines substances peuvent être des substrats pour les micro-organismes, d'autres agissent en tant que vitamines (PARK, 1963). Les spores de certains champignons sont incapables de germer quand on les introduit dans un sol non stérile à cause d'un facteur fongistatique ; ce phénomène de la fongistase existe dans tous les sols naturels ; il empêche la germination des conidies, des chlamydospores et des microsclérotés.

LOUVET (1971) a mentionné que les spores de certains champignons telluriques ne germent chaque année que pendant une très courte période de l'hiver, période au cours de laquelle des sucres réducteurs sont disponibles dans le sol. Ces sucres semblent annuler les principales propriétés fongistatiques du sol.

La levée de la fongistase serait due selon ELNAGHY et coll. (1971) à :

- la stimulation directe qui élimine l'influence inhibitrice exercée par la microflore ;
- la neutralisation de substances inhibitrices ;

- l'inhibition des autres micro-organismes par des substances antibiotiques, ce qui diminue la compétition pour les éléments nutritifs.

La fongistase est levée à des degrés divers par les exsudats racinaires : LAWRENCE et coll. (1963) ont montré que les exsudats racinaires de Tomate (hôte) lèvent beaucoup la fongistase de *Verticillium albo-atrum* par rapport aux exsudats de Blé (non hôte).

La fongistase de *Pyrenochaeta lycopersici* est plus ou moins levée par les exsudats racinaires de différentes espèces de Tomate (KHALIL, 1971).

La germination des sclérotés de *Sclerotium cepivorum* dans la terre et dans le sable non stériles est nulle même avec différentes capacités de rétention ; si on cultive des Oignons dans la terre ou dans le sable, le taux de germination atteint 83% (COLEY-SMITH et coll., 1957). Selon ces auteurs, les racines exsudent des substances qui stimulent la germination des sclérotés.

Les oospores de *Pythium mamillatum* ne germent pas en l'absence de plantules de Navet dans le sol mais germent en boîtes de Pétri dans l'eau distillée ; les exsudats racinaires de Navet stimulent la germination des oospores par rapport à l'eau distillée. Ce travail montre que certaines substances stimulantes solubles dans l'eau sont libérées par les racines ; les acides aminés ou les sucres ou bien les acides aminés en association avec les sucres doivent augmenter suffisamment le niveau nutritif autour des racines, ce qui favorise la germination des oospores dans la rhizosphère (BARTON, 1957).

Un type particulier de fongistase se rencontre dans le cas des chlamydospores de *Fusarium* qui germent en présence de terre, mais le champignon reforme immédiatement des chlamydospores ; en présence de plantules de Blé, de Pois et de Laitue, ces spores germent et le champignon se développe. Cela s'explique parce que les exsudats renferment des substances qui lèvent la fongistase (JACKSON, 1957).

Les exsudats racinaires d'une variété de Pois sensible à *Fusarium oxysporum* f. *pisi*, stimulent la croissance et la sporulation de la majorité des germes de la rhizosphère, celle de la variété résistante ne contient pas plus de micro-organismes inhibiteurs que la variété sensible.

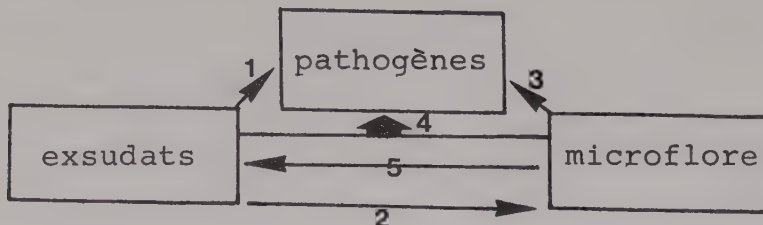
Les micro-organismes isolés de deux variétés ne diffèrent pas qualitativement mais il y a plus de micro-organismes par unité de poids sec de sol rhizosphérique chez la variété sensible que chez la variété résistante (BUXTON, 1960).

Pour PARK (1963), la plante hôte stimule les pathogènes de deux manières :

- soit directement
- soit indirectement, en inhibant la microflore rhizosphérique, ce qui a pour effet de permettre un meilleur développement des pathogènes.

Dans les deux cas, le mycélium de ces derniers croît à la surface des racines, même avant toute pénétration ou infection.

Les exsudats racinaires peuvent affecter les pathogènes et les autres éléments de la microflore de la rhizosphère 1, 2.



La microflore affecte les pathogènes 3 ; quand son action est combinée avec celle des substances des exsudats, elle a un autre effet 4.

Les interactions 1, 2 et 3 sont primaires, mais 4 dépend de la disponibilité et du type des éléments dans les exsudats (BUXTON, 1960); l'action de 5 peut changer quantitativement et qualitativement les exsudats racinaires (ROVIRA, 1959 ; LYNN et coll., 1970 et BUSHAN, 1971).

Dans les conditions favorables de sol, particulièrement en association avec les racines des plantes supérieures où les matières organiques sont abondantes, certains micro-organismes peuvent produire des antibiotiques qui seront absorbés par les racines et donneront une certaine protection contre les nouvelles infections (PARK, 1963).

P R E M I E R E P A R T I E

E T U D E D E L A S E N S I B I L I T E

V A R I E T A L E

INTRODUCTION -

L'organisme, objet de notre étude, est *Pyrenochaeta lycopersici*, agent de la maladie des racines liégeuses de la Tomate.

La maladie est caractérisée par des lésions brunâtres sur le système racinaire, pouvant aller jusqu'à la destruction des racines attaquées.

Les lésions brunes dans le système racinaire peuvent être d'origine physiologique. COOKE (1962) a montré qu'elles résultent d'une accumulation de NH_3 issu de l'hydrolyse de l'urée.

ULJEE (1964) décrit des symptômes analogues au "Brown root rot" sans pouvoir associer cette maladie à un agent pathogène ; il conclut à une accumulation de NH_3 dans les sols traités à la vapeur.

TERMOHLEN (1962) a noté un brunissement des racines dû à une déficience du sol en O_2 .

L'examen précoce de jeunes racines (5 - 10 semaines) peut donner une idée de la gravité de l'attaque et de la nécessité ainsi que de l'importance de la stérilisation à effectuer à la fin de la culture (LAST et coll. 1969).

EBBEN et WILLIAMS (1956) ont établi que la gravité de la maladie est directement associée à l'étendue des lésions brunes pendant les trois premiers mois de végétation ; ils ont établi une relation inverse entre le pourcentage de "Brown root rot" pendant les neuf premières semaines et le rendement.

Lorsque le taux d'inoculum dans le sol est important, l'attaque du système racinaire est plus précoce, la destruction rapide des jeunes racines entraîne une diminution du pourcentage de racines liégeuses (LAST et EBBEN, 1966 et LAST et coll., 1969) ; ce phénomène est généralement observé dans des serres non stérilisées et portant des Tomates tous les ans.

Les espèces et variétés de *Lycopersicon* réagissent différemment à *P. lycopersici*, les variétés cultivées sont en général sensibles aussi bien au stade plantule qu'au stade adulte, les espèces sauvages sont pour la plupart résistantes y compris *L. peruvianum* (TERMOHLEN, 1962).

BESRI (1970) a classé les différentes espèces et variétés de Tomate en plantes sensibles (toutes les variétés cultivées), semi-résistantes (*L. peruvianum*) et résistantes (*L. hirsutum*).

Nous avons d'abord examiné le comportement des trois espèces en sol contaminé par *P. lycopersici* afin de vérifier les résultats et conclusions de TERMOHLEN et de BESRI.

Espèce	Sensibilité à <i>P. lycopersici</i>	Origine
<i>Lycopersicon esculentum</i> Var. Marmande	sensible (S)	Vilmorin (France)
<i>L. peruvianum</i>	semi-résistante (S-R)	U.S.A.
<i>L. hirsutum</i>	résistante (R)	U.S.A.

I MATERIEL ET METHODES -

A - Préparation des piluliers :

Nous avons utilisé des piluliers de 150 ml (10 cm de hauteur, 4,5 cm de diamètre) dans lesquels nous avons mis 120 g du sol contaminé provenant de serres (54 - St MAX). Ce sol est séché à la température du laboratoire pendant 4 jours ; il est ensuite tamisé à 0,99 mm (module 20).

Les graines de trois espèces de Tomate sont mises à germer aseptiquement dans des boîtes de Pétri sur couche mince de gélose ; les plantules sont transplantées 5 jours après à raison d'une plantule dans chaque pilulier.

Nous avons arrosé chaque plantule avec 60 ml d'eau après la plantation puis avec 10 ml toutes les semaines.

Les plantules sont arrachées au bout de 21 et 50 jours.

B - Etude des lésions :

Les racines sont bien lavées à l'eau courante et étalées en boîte de Pétri sur papier millimétré ; 6 racines latérales sont choisies au hasard et la longueur des lésions est mesurée sous la loupe.

Les chiffres donnés représentent la moyenne de 6 plantes et sont ramenés à 100 mm de racine.

Nous n'avons pas vérifié l'origine des brunissements de sorte que les données ci-dessous ne peuvent être considérées que comme indicatives. Il est en tout cas prouvé que *L. hirsutum* peut être contaminé par *P. lycopersici* au moins au stade plantule (HARRANGER, 1973).

II RESULTATS -

Les résultats sont présentés dans le tableau (I). Nous remarquons que :

1) Au bout de 21 jours, les lésions chez la variété sensible représentent 15,4 % de la longueur des racines ; par contre, ce chiffre diminue jusqu'à 3,6 % chez l'espèce semi-résistante et 2,3 % chez l'espèce résistante.

2) Au bout de 50 jours, les lésions dépassent la moitié du système racinaire chez Marmande (51,4 %) tandis que *L. peruvianum* montre 28,9 % de lésions dans son système racinaire et *L. hirsutum* 14,1 %.

TABLEAU (I)

Longueur des lésions sur 100 mm de racine (21 jours)

Espèce	1	2	3	4	5	6	M
sensible	1,3	12,4	16,5	16,9	18,7	15,3	15,4
semi-résistante	3,2	3,7	4,5	2,9	3,5	3	3,6
résistante	1,9	2	3,8	1,6	2,8	1,8	2,3

Longueur des lésions sur 100 mm de racine (50 jours)

sensible	56,6	49,5	51,9	46,2	49,3	55,2	51,4
semi-résistante	32,3	33	28,3	22	26,5	31,6	28,9
résistante	16,8	15,5	16	11,5	14	10,9	14,1

III DISCUSSION -

Nos résultats sont en accord avec le classement de BESRI (1970). Il nous semble que la résistance de l'espèce *L. peruvianum* se perd avec l'âge de la plante.

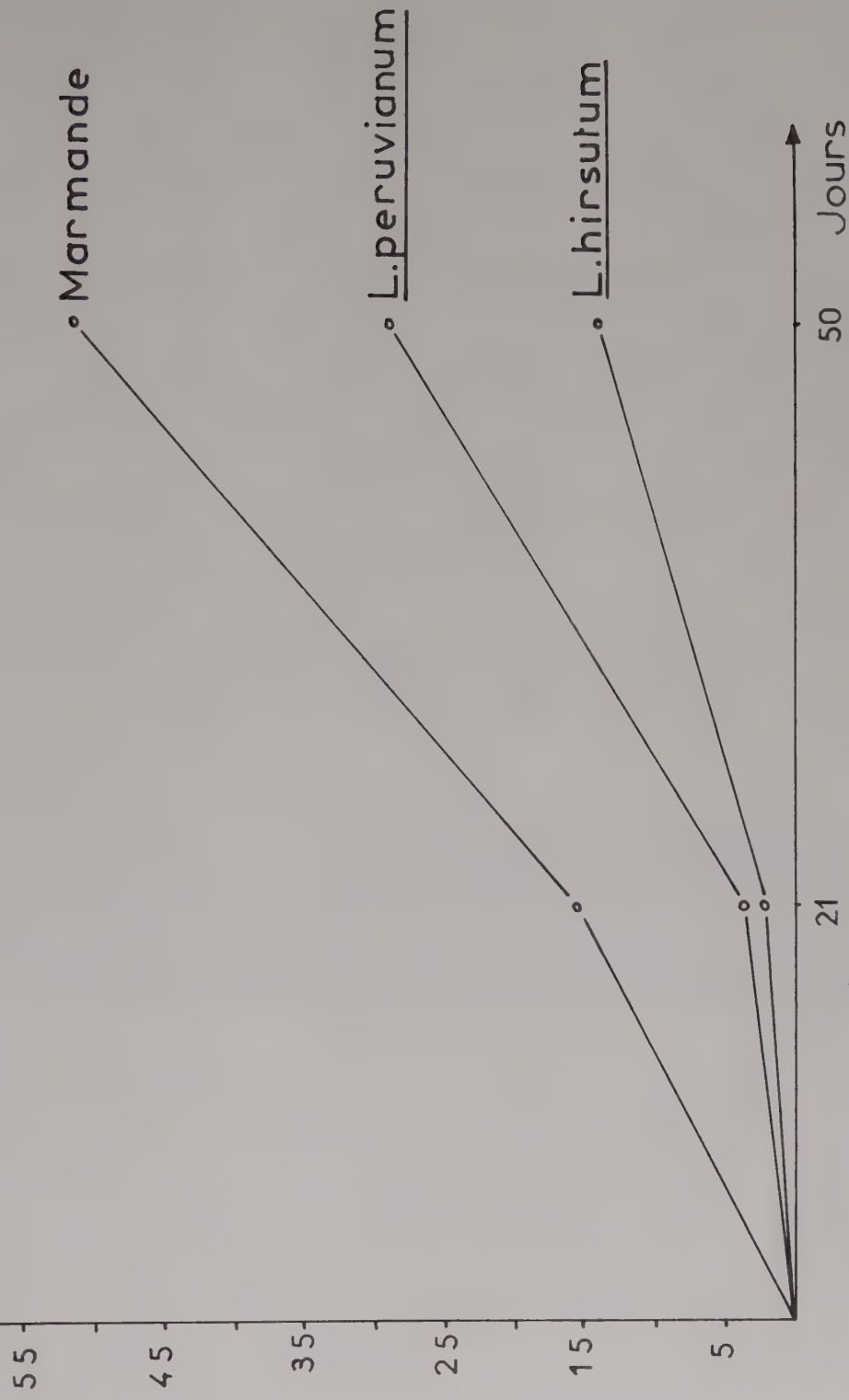
Nous proposons deux hypothèses :

1) La moindre sensibilité de *L. peruvianum* est due peut-être à un retard dans l'attaque du système racinaire (BESRI, loc. cit.). Ceci nous a amené à penser que les exsudats racinaires pourraient gêner le développement du parasite.

2) Le parasite pénètre dans les racines de l'espèce résistante mais celle-ci réagit en empêchant la progression du parasite ou en l'éliminant. Cette deuxième hypothèse concorderait avec les résultats de BESRI qui n'a pas pu isoler *P. lycopersici* à partir des racines infectées de *L. hirsutum*.

Longueur des lésions
sur 100 mm de racine

(Fig. 1)



Evolution des lésions au cours de la croissance

végétative de trois espèces de tomate.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE

DES EXSUDATS RACINAIRES

I OBTENTION DES EXSUDATS RACINAIRES -

Nous avons exprimé plus haut l'hypothèse que les différences de composition des exsudats racinaires des trois espèces de Tomate étudiées pourraient intervenir dans les différences de comportement de ces espèces vis-à-vis de *P. lycopersici*. C'est pourquoi nous avons cultivé les trois espèces en milieu artificiel et récolté les exsudats racinaires produits.

Puisque la sensibilité des espèces varie avec l'âge, au moins dans le cas de *L. peruvianum*, nous collectons les exsudats après différentes durées de culture : 10, 21 et 50 jours.

A - Méthode de culture :

1) Traitement préalable du sable :

Le sable utilisé comme support de nos cultures est du sable extra-siliceux (Diamètre des grains compris entre 2 et 4mm) ayant subi les traitements suivants :

- lavage à l'eau courante sur tamis pendant 12 heures ;
- séjour de 48 heures dans un bain de HCl concentré suivi d'un lavage de 2 heures à l'eau courante ;
- séjour de 48 heures dans un bain de H_2SO_4 concentré suivi d'un lavage de 4 heures à l'eau courante ;
- lavage à l'eau distillée, contrôlé par mesure du pH ;
- séchage à l'étuve à 80-100°C.

2) Milieu de culture :

Nous avons utilisé le milieu suivant :

Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	1,172 g
K NO ₃	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,136 g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,24 g
H ₂ O dist.	1000 ml

Nous avons ajouté 1 ml de chacune des solutions suivantes:

H ₃ BO ₃	2,86 g/l
Mn SO ₄ , H ₂ O	1,81 g/l
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,252g/l
Zn Cl ₂	0,104g/l
Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,079g/l
Ca SO ₄ , 7H ₂ O	0,0476g/l

Puis 1 ml de chélate de fer obtenu comme suit :

EDTA (sel disodique)	6,665 g
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	4,980 g
KOH (N)	32,5 ml
H ₂ O dist.	500 ml

3) Germination des semences :

Les semences sont stérilisées superficiellement par immersion pendant 30 secondes dans une solution à 0,1 % de Hg Cl₂ :

Hg Cl ₂	1 g
Alcool 95°	500 ml
H ₂ O dist.	500 ml

Puis elles sont lavées 3-4 fois à l'eau distillée stérile. Cinq semences de Tomate sont déposées dans chaque boîte de Pétri stérile sur couche mince d'eau gélosée à 1 %, ensuite les boîtes sont mises à l'étuve à 20°C pendant 4 jours. Toute boîte contenant au moins une semence contaminée est éliminée.

4) Culture aseptique dans les fioles d'Erlenmeyer :

Nous utilisons des fioles d'Erlenmeyer de deux litres pourvues d'un orifice latéral. 1,5 Kg de sable lavé est introduit dans chaque fiole, puis nous ajoutons 300 ml de la solution nutritive. Les fioles sont bouchées avec du coton ; l'ensemble est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 40 minutes.

Après refroidissement des fioles, les plantules sont repiquées aseptiquement dans le sable à raison de 30 plantules dans chaque fiole, grâce à l'orifice latéral. Pour que les racines soient à l'obscurité, nous avons entouré la base des récipients de papier noir.

B - Conditions de culture :

ROVIRA (1959) a montré que l'intensité lumineuse accroît l'excrétion de leucine, glutamine, phénylalanine et acide aspartique dans les exsudats racinaires de Tomate ; lorsqu'on réduit l'éclairement, il en résulte une augmentation de sérine et d'asparagine. L'éclairage a été fourni par 3 lampes à incandescence de 500W placées à 60 cm des plantes pour une enceinte de 90 x 60 x 60 cm pendant 12 heures. Une température élevée (32-41°C) augmente l'exsudation des acides aminés, mais cette augmentation est plus importante dans les exsudats de 15 jours que de 30 jours. En général, une température élevée active l'exsudation des racines (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970).

D'après VANCURA et coll. (1965), la tyrosine et la cystine existent dans les exsudats de Tomate au stade de la fructification.

Planche I



Tomate en culture aseptique

MINSHAL (1968) a trouvé que les exsudats racinaires de Tomate diffèrent quantitativement et qualitativement selon l'âge des plantes ; c'est pourquoi, il peut être intéressant de recueillir les exsudats après différentes périodes de culture.

BOULTER et coll. (1966, cité par ROVIRA, 1969) ont montré que certains acides aminés (acide aspartique, thréonine, sérine et α -alanine) étaient plus abondants dans les exsudats de Pois cultivés sur sable qu'en culture en milieu liquide. Les exsudats racinaires dans le sol diffèrent de ceux obtenus sur sable et en culture liquide à cause de différents facteurs physiques et chimiques de l'environnement (VANCURA et coll. 1969, REDINGTON et coll. 1971).

ROVIRA (1959) a montré que la concentration en Ca^{++} dans le milieu nutritif peut agir sur la quantité des acides aminés dans les exsudats de Tomate.

D'une façon générale, la composition du milieu de culture influence celle des exsudats racinaires (MINSHAL, 1968).

L'existence des micro-organismes sur et autour des racines de Tomate entraîne une diminution des acides aminés dans les exsudats racinaires (ROVIRA, 1959).

Nos cultures ont été réalisées dans les conditions suivantes :

1) Lumière :

Les fioles de culture sont placées sur des tables à 50 cm de la lumière (l'éclairage est fourni par des tubes à fluorescence, type GroLux et atteint 2000 lumens).

La photopériode est de 14 heures d'éclairage, 10 heures d'obscurité.

2) Température :

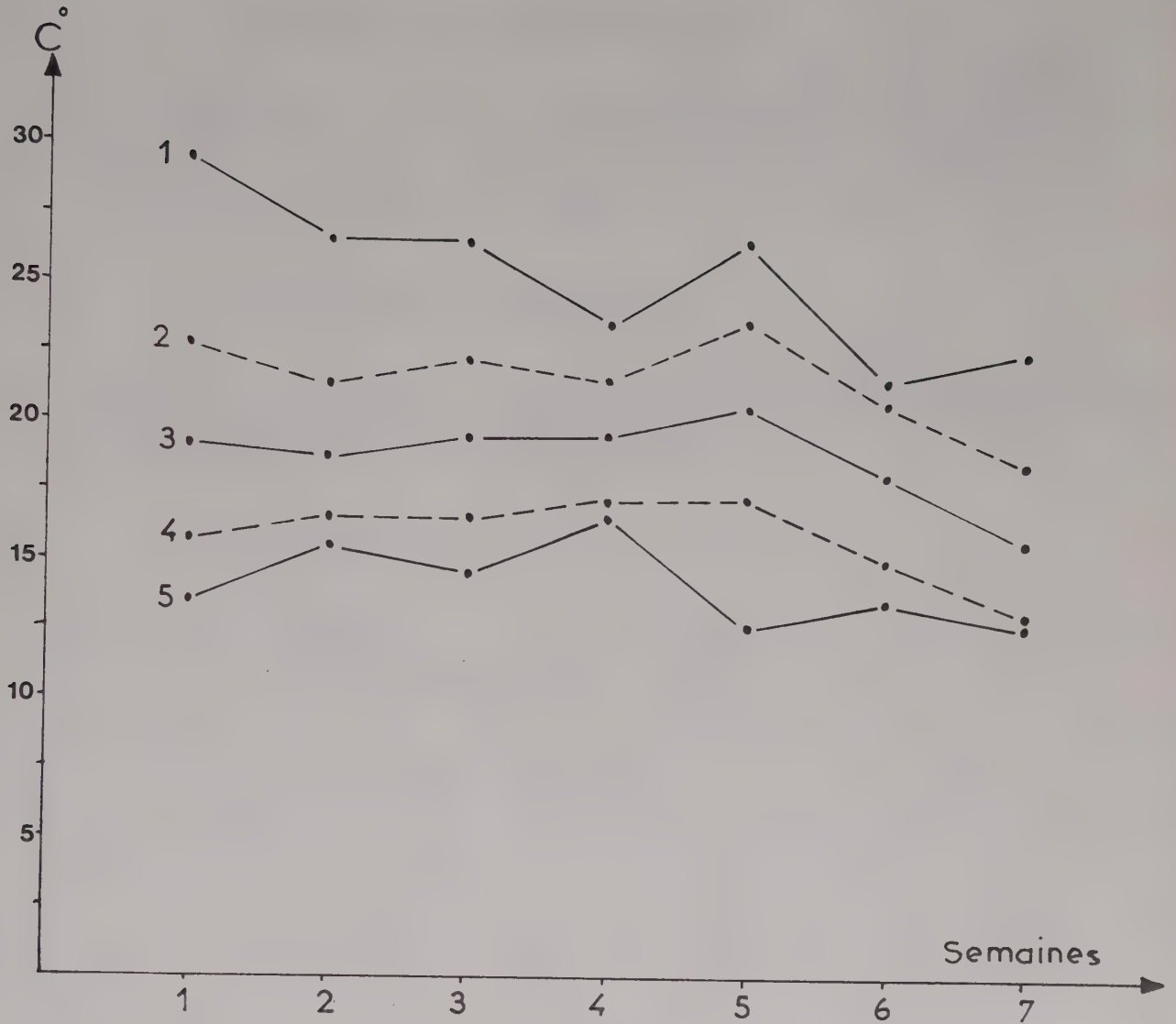
Nous avons enregistré la température pendant toute la période de la culture ; la figure (2) présente nos résultats.

3) Durée de la culture :

Nous avons collecté les exsudats racinaires après 10, 21 et 50 jours.

(Fig. 2)

La température au cours de la culture.



1-Maxima hebdomadaires.

2-Moyennes hebdomadaires des maxima.

3- ≡ ≡

4- ≡ ≡ des minima.

5-Minima hebdomadaires.

4) Support et milieu de culture :

Les cultures sont réalisées sur sable auquel on ajoute un milieu nutritif artificiel (P. 15).

C - Récolte des exsudats stériles :

Nous avons récupéré les exsudats en versant, aussi aseptiquement que possible, le liquide de culture par l'orifice latéral de chaque fiole puis nous avons introduit 300 ml d'eau distillée stérile pour laver le sable et récupéré de même cette eau pour l'ajouter à l'exsudat initial.

D - Contrôle de la stérilité :

Il est effectué au 10ème, 21ème et 50ème jour ; au moment où nous versons les exsudats nous en avons déposé quelques gouttes dans des boîtes de Pétri renfermant différents milieux :

1) Extrait de malt	2 %
Gélose	1,5 %

2) PDA	20 g
Gélose	10 g
Extrait de levure	2 g
H ₂ O distillée	1000 ml

3) Milieu de CZAPEK-Dox :

- Na NO ₃	2 g
- KH ₂ PO ₄	1 g
- KCl	0,5 g
- Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
- Fe SO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
- Saccharose	30 g
- Extrait de levure	2 g
- Agar agar	15 g
- H ₂ O distillée	1000 ml

pH = 5,3

Nous avons mis les boîtes de Pétri à l'étuve à 27°C pendant une semaine ; les exsudats obtenus à partir de fioles contaminées sont éliminés.

E - Concentration des exsudats :

Les produits sont centrifugés (30 minutes à 4000 tours/minute) (VANCURA, 1964), ensuite filtrés et concentrés sous pression réduite à + 40°C puis lyophilisés; les produits secs de chaque espèce sont mélangés et conservés à -20°C.

Par cette méthode, la quantité de produits secs obtenus est de l'ordre de 0,3 g pour 100 ml de liquide de culture et nous n'avons pas observé de différences entre les trois espèces en raison des quantités importantes de sels minéraux présents. Pour l'analyse, le produit lyophilisé est redissous dans l'eau à raison de 0,12 g pour 100 ml et constitue ce que nous appellerons solution d'exsudat.

II CHROMATOGRAPHIE -

A - Chromatographie échangeuse d'ions :

1) Chromatographie des acides aminés :

Les acides aminés totaux sont obtenus par passage d'une solution d'exsudats à 0,12 g/100 ml sur une colonne (DOWEX 50X8, 20-50 mesh, forme H⁺) de 37 cm de longueur et de 1 cm de diamètre.

L'activation de la résine cationique forme H⁺ et la préparation de la colonne ont été décrites dans un travail précédent (ELOUCH, 1971).

Chromatographie :

Sur la colonne préparée, nous avons introduit la solution à analyser ; nous l'avons laissée s'écouler (30 gouttes/minute) puis la résine est lavée avec 50 ml d'eau distillée. Ce lavage élimine les acides organiques et les substances neutres. Nous avons élué alors les acides aminés

qui sont fixés sur la résine à l'aide de 75 ml d'ammoniaque à 13,5 % (VANCURA, 1964 - VANCURA et HOVADIK, 1965).

Le passage de l'ammoniaque sur la colonne est suivi par le changement de couleur de la résine.

L'éluat est concentré sous vide dans un bain-marie à + 40°C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec ; celui-ci est repris par 1 ml d'eau distillée et conservé à - 20°C ; cette solution est prête à être analysée par chromatographie sur couche mince de cellulose ou par Technicon.

2) Chromatographie des sucres :

Les sucres sont obtenus par passage sur une résine anionique (DOWEX 1 X 8, 20-50 mesh, forme Cl^-) qui retient les acides organiques que nous n'avons pas récupérés car l'analyse des exsudats de 21 jours non stériles de trois espèces n'a pas montré des différences dans ces composés (EL OUCH, 1971).

Cette résine a été activée et amenée sous la forme HCOO^- par le formiate de Na (EL OUCH, 1971). Sous cette forme, l'échange est plus rapide et indépendant du pH de la solution à analyser ; de plus, le glucose ne se dégrade pas et la résine fixe les acides organiques les plus faibles (NORDMANN et coll., 1954).

Chromatographie :

La solution effluente qui a traversé la résine cationique précédente est introduite dans la colonne de résine anionique forme HCOO^- . La vitesse de passage sur la colonne est de 20 gouttes/minute ; la colonne est lavée avec 50 ml d'eau distillée après avoir terminé l'opération ; ce lavage élimine les substances neutres.

La solution qui reste après avoir traversé les deux colonnes précédentes contient les substances neutres dont les sucres ; cette solution est concentrée sous pression réduite à + 40°C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec : celui-ci est repris par 1 ml d'eau distillée et conservée à - 20°C. La solution est prête à être analysée par chromatographie sur couche mince de cellulose.

B - Chromatographie des sucres sur couche mince de cellulose :

1) Matériel et Méthodes :

a) Préparation de la phase stationnaire :

Nous avons utilisé la poudre de cellulose MN 300, car elle donne la meilleure séparation à raison de 15 g pour 100 ml d'eau distillée, ceci pour 5 plaques 20 x 20 cm. L'épaisseur de la couche est de 0,5 mm ; les plaques sont séchées à la température ordinaire pendant une nuit.

b) Dépôts :

Ils sont réalisés avec différentes quantités selon le sensibilité du révélateur, à 2 cm des bords de la plaque.

c) Solvants et temps de migration :

(cf. EL OUCH, 1971)

1. n-Butanol-acide acétique-eau (4-1-5 V/V)
2. Benzène-n-Butanol-pyridine-eau (1-5-3-3 V/V)
3. Acétate d'éthyle-pyridine-eau (2-1-2 V/V)
4. Isopropanol-pyridine-acide acétique-eau (8-8-1-4 V/V)
5. n-Butanol-pyridine-eau (3-4-2 V/V)
6. n-Butanol-acide acétique-eau (3-1-1 V/V)

d) révélation : (cf. EL OUCH, 1971)

On pulvérise sur les plaques une des solutions suivantes :

1. Benzidine
2. P-anisidine
3. Nitrate d'argent
4. Phtalate d'aniline.

La caractérisation des sucres de l'échantillon est assez aisée à l'aide de témoins de sucres connus. Nous déposons en même temps que la solution à analyser, 1 µl d'une solution à 1 % de sucre connu.

2) Résultats :

Nous avons obtenu la meilleure séparation avec le solvant suivant : n-Butanol, acide acétique, eau (3-1-1 V/V) en faisant la migration deux fois dans la même direction. Après avoir réalisé la première migration, nous avons séché les plaques une heure à l'air froid puis nous avons remis ces plaques dans les cuves de développement pour réaliser la deuxième migration.

Parmi les révélateurs utilisés, la P-anisidine paraît le meilleur pour tous les sucres examinés. Elle donne des taches jaunes avec le fructose, le saccharose et le lactose, brun foncé avec le ribose et le xylose, brun clair avec le glucose et le maltose, mais sa sensibilité est faible par rapport au nitrate d'argent, c'est pourquoi il faut déposer un peu plus sur les plaques.

Le révélateur au nitrate d'argent est très sensible ; on dépose sur les plaques très peu de solution à analyser car, si on dépose beaucoup, les taches seront attachées l'une à l'autre. Ce révélateur ne révèle pas le saccharose, il donne des taches noires avec tous les sucres réducteurs.

Le phtalate d'aniline donne des taches brunes avec tous les sucres sauf le saccharose qui n'est pas révélé ; il est plus sensible avec le glucose et le galactose.

Les solvants 3 et 4 donnent des taches prolongées et il n'y a pas beaucoup de différences entre les RF des différents sucres. Le solvant 5 sépare beaucoup mieux le glucose et le galactose. Nos analyses montrent qu'il y a des traces de glucose, de fructose et de saccharose dans les exsudats de 10 et 21 jours de la variété sensible, mais nous n'avons détecté aucun sucre chez l'espèce résistante et l'espèce semi-résistante dans les mêmes périodes. Au stade de 50 jours, nous avons bien détecté le glucose, le fructose et le saccharose chez les trois espèces ; la variété sensible et l'espèce semi-résistante en exsudent plus que l'espèce résistante.

La variété sensible exsude plus de saccharose que l'espèce semi-résistante qui exsude à son tour plus que l'espèce résistante.

Le glucose et le fructose sont révélés en plus grande concentration chez l'espèce semi-résistante que chez la sensible, tandis que chez la résistante, le glucose et le fructose sont beaucoup moins abondants que chez les autres espèces. Tableau (II).

3) Discussion :

L'identification des sucres dans les exsudats racinaires de Tomate a été effectuée par ROVIRA (1959) qui a montré l'existence du glucose dans les exsudats de Tomate cultivée à des températures de 15-31°C.

Par contre, LAWRENCE et coll. (1963) n'ont pas révélé de monosaccharides dans les exsudats de 10 et 25 jours de Tomate cultivée à la température du laboratoire, mais VANCURA et coll. (1965) ont montré que les exsudats racinaires de Tomate renferment, pendant le stade de croissance: maltose, galactose, glucose, fructose, ribose, désoxyribose et rhamnose.

Ces résultats ont été obtenus dans des conditions différentes : peut-être est-ce la raison des différences observées avec nos propres résultats.

Plusieurs travaux montrent que l'exsudation des sucres est influencée par certains facteurs : température, espèce végétale, âge de la plante et micro-organismes de la rhizosphère (BUXTON, 1962 ; VANCURA, 1967 ; YANG et coll., 1970 et BUSHAN et coll., 1971).

Chez la variété sensible, les exsudats racinaires stériles de 21 jours contiennent des traces de glucose, de fructose et de saccharose tandis que ces substances sont absentes des exsudats non stériles (EL OUCH, 1971); peut-être sont-elles utilisées comme une source de carbone par les micro-organismes de la rhizosphère.

L'influence des sucres sur des micro-organismes pathogènes a déjà fait l'objet de nombreuses recherches:

TABLEAU (II)

Teneur en sucres libres dans les exsudats racinaires stériles
de différentes espèces de Tomate pendant trois périodes de
croissance : 10, 21 et 50 jours

Espèce	Age des exsudats	Glucose	Fructose	Saccharose
Marmande	10 jours	Traces	Traces	Traces
	21 jours	Traces	Traces	Traces
	50 jours	++	++	+++
<i>L. peruvianum</i>	10 jours	-	-	-
	21 jours	-	-	-
	50 jours	+++	+++	++
<i>L. hirsutum</i>	10 jours	-	-	-
	21 jours	-	-	-
	50 jours	+	+	Traces

+ : Taches faiblement colorées

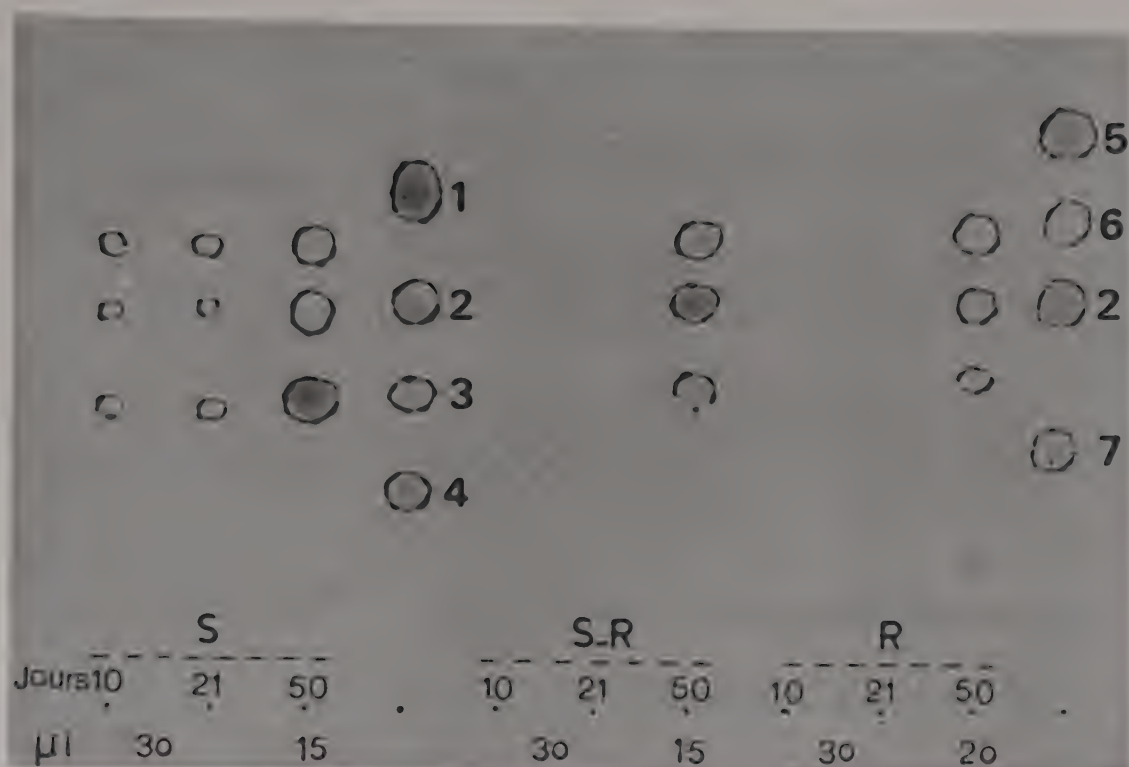
++ : Taches moyennement colorées

+++ : Taches fortement colorées

Planche II

Chromatographie sur couche mince de CELLULOSE.

(MN 300)



Solvant: n-Butanol, acide acétique, eau. (3,1,1 V/V)

Révélation: p-Anisidine phosphate

1-Xylose. 2-Glucose. 3-Saccharose. 4-Lactose.

5-Ribose. 6-Fructose. 7-Maltose.

S: Marmande. S-R: L. peruvianum. R: L. hirsutum.

KHALIL (1973) a profité de nos analyses et a montré que le glucose, le saccharose et le fructose lèvent la fongistase de *P. lycopersici*, mais cette levée est plus importante en présence de glucose pour les mêmes concentrations en carbone.

C - Analyse des acides aminés :

1) Chromatographie sur couche mince de cellulose :

Au cours d'un précédent travail (EL OUCH, 1971), nous avons analysé la composition d'exsudats racinaires obtenus après 21 jours de culture en conditions non stériles.

L'analyse, par chromatographie sur couche mince de cellulose, nous a donné les résultats indiqués dans le tableau (III) .

2) Analyse au Technicon des acides aminés :

a) Matériel et Méthodes :

Nous avons utilisé une colonne de 150 cm remplie avec de la résine (type A 18, 25 μ) qui nous a permis de séparer tous les acides aminés en 21 heures. La température de la colonne est de 60°C.

Pour cette analyse, nous avons utilisé deux tampons (MARY, 1965) :

1. 0,05 M Citrate de sodium pH = 2,875
2. 0,267 M Citrate de sodium pH = 4,74

Il faut vérifier le pH de la solution tampon tous les trois jours et réajuster si nécessaire.

TABLEAU (III)

Teneur en acides aminés des exsudats racinaires
de trois espèces de Tomate non stériles au bout de 21 jours

Acides aminés	Espèces		
	S	S.R	R
Leucine	+	+	+
Valine	+	+	+
γ -aminobutyrique	+	-	-
Tyrosine	-	++	++
α -alanine	++	++	++
Non identifié RF = 0,51	+	+	+
A. glutamique	+	+	+
Non identifié RF = 0,4	+	+	+
Glutamine + A. aspartique	++	++	++
Asparagine	++	+	Traces
Arginine	++	+	+
Ornithine	+	+	+

+ : Taches moyennement colorées
++ : Taches fortement colorées

On met les tampons dans l'autograde qui est constitué de 9 chambres, de la façon suivante :

Chambre	Tampon 1	Tampon 2
1	75 ml	0
2	75 ml	0
3	75 ml	0
4	75 ml	0
5	75 ml	0
6	15 ml	60 ml
7	0	75 ml
8	0	75 ml
9	0	75 ml

b) Résultats :

Dans les résultats présentés dans le tableau (IV) on remarque que :

1. Au stade de 10 et 21 jours, les exsudats racinaires de Marmande sont plus riches quantitativement que ceux de *L. peruvianum* qui sont à leur tour plus riches que ceux de *L. hirsutum*.

2. Au stade de 50 jours, les exsudats de l'espèce semi-résistante deviennent plus riches que ceux de la variété sensible tandis que ceux de l'espèce résistante restent assez pauvres.

3. Chez les trois espèces, la teneur en acides augmente avec l'âge des plantes. (Fig. 3).

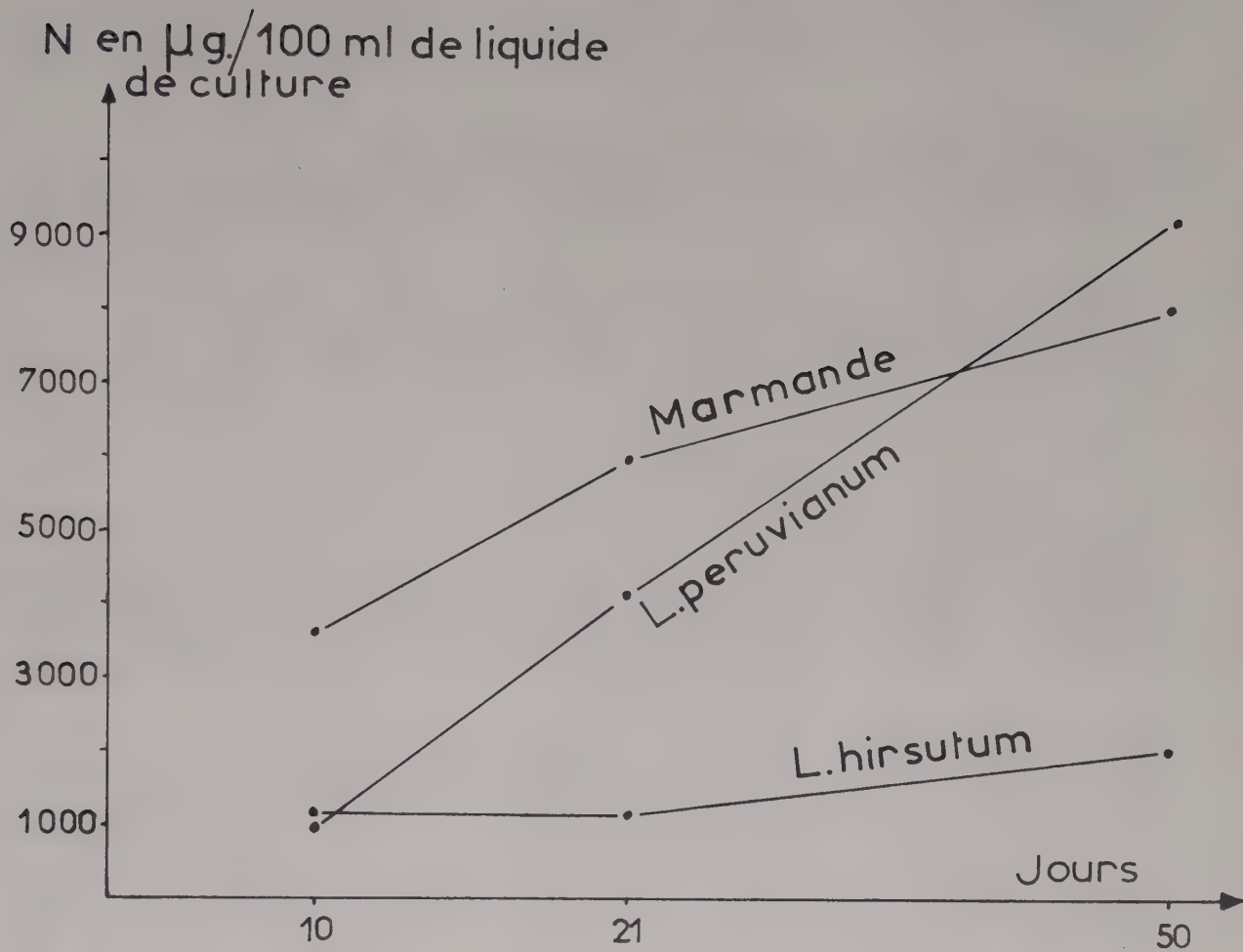
4. L'asparagine a été identifiée uniquement au stade de 50 jours chez la variété sensible.

TABLEAU (IV)

Teneur (en $\mu\text{g d'N}$) en acides aminés par 100 ml de liquide
de culture

Espèce Acide \ Jour	Marmande			<i>L. peruvianum</i>			<i>L. hirsutum</i>		
	10	21	50	10	21	50	10	21	50
Ac. aspartique	363	543	1940	215	517	889	-	214	453
Thréonine	182	322	214	43	418	405	-	151	61
Sérine	747	365	422	281	388	466	-	146	221
Asparagine	-	-	205	-	-	-	-	-	-
Ac. glutamique	129	356	1242	70	187	835	-	17	195
Citrulline	-	123	956	-	T	270	-	-	-
Glycine	542	326	292	193	217	490	159	96	136
α -Alanine	303	561	260	136	291	1157	373	66	138
α -NH ₂ isobutyrique	-	-	-	-	-	686	-	-	-
Valine	239	846	342	T	315	1342	-	55	180
Cystéine	-	26	-	-	-	4	-	-	14
Méthionine	-	51	-	-	126	118	T	-	33
Isoleucine	T	184	160	T	99	406	203	14	53
Leucine	87	339	334	T	156	771	91	24	64
Tyrosine	T	36	154	-	21	42	-	13	15
Phénylalanine	T	138	278	-	79	268	-	14	34
γ - NH ₂ butyrique	-	72	214	-	T	-	-	-	34
Ornithine	804	475	512	-	458	590	-	191	108
Lysine	184	571	162	-	303	1066	-	51	124
Histidine	-	243	328	-	221	446	-	73	57
Arginine	-	347	T	-	343	-	322	-	-
TOTAL	3580	5924	8015	938	4139	9251	1148	1125	1994

(Fig. 3)



Teneur des exsudats en N au cours de la
croissance végétative des plantes.

5. La citrulline a été identifiée en grande quantité au stade de 2I et 50 jours chez la variété sensible et en quantité moindre chez l'espèce semi-résistante, tandis qu'elle est absente chez l'espèce résistante.

6. Parmi les différences remarquables entre variété sensible et espèce résistante, nous notons la présence en grande quantité chez la première, des acides aspartique et glutamique.

7. Une augmentation qualitative se manifeste chez les trois espèces au cours de la croissance végétative.

c) Discussion :

De nombreuses recherches ont été effectuées sur l'analyse des acides aminés dans les exsudats racinaires de différentes espèces végétales (SULOCHANA, 1962 ; AGNIHOTRI et coll., 1967 et 1968 ; DJAVADI, 1968 ; LYNN et coll., 1970 ; YUNG et coll., 1970).

ROVIRA (1959) a montré l'existence de 14 acides aminés dans les exsudats racinaires (2-4 mois) de Tomate, variété South Australian Early Dwarf obtenus en culture axénique où l'arginine, la lysine, l'ornithine, l'histidine, l'isoleucine et la citrulline n'étaient pas identifiées. Par contre, VANCURA et coll. (1965) ont trouvé, au premier stade de croissance de la variété Imun, l'ornithine, la citrulline, la leucine (Isoleucine), l'asparagine, la glutamine, l'acide aspartique, la sérine, la glycine, l'acide glutamique, la thréonine, l' α -alanine, la proline, l'acide γ -amino-butyrique, la méthionine (valine), la phénylalanine et un autre acide aminé non identifié.

Au stade de la fructification, ces auteurs ont détecté la tyrosine et la cystine et trois autres acides aminés non identifiés.

NOUR EL DIN et coll. (1964) ont montré que les exsudats racinaires (21 jours) d'une variété de Tomate sensible à *Rhizoctonia solani* sont quantitativement et qualitativement plus riches (acide glutamique, acide aspartique, leucine, glycine, alanine, phénylalanine et cystine) que ceux d'une autre variété résistante (acide glutamique, acide aspartique, leucine et cystine).

Nos analyses montrent l'existence de ces acides sauf la proline et la glutamine, par contre, nous avons trouvé en plus la lysine, l'histidine et l'arginine.

Ces différences peuvent être dues au fait que les auteurs n'ont pas étudié les mêmes variétés et n'ont pas travaillé dans les mêmes conditions ; nous avons déjà mentionné que l'exsudation des acides aminés est influencée par certains facteurs.

L'analyse des exsudats non stériles de 21 jours montre l'absence de la thréonine, la sérine, la citrulline, la glycine, la cystéine, la méthionine, la phénylalanine, la lysine et l'histidine (Tableau III et tableau IV). Cependant, nous avons relevé la présence de deux acides aminés non identifiés.

Nous n'avons pas identifié l'asparagine au stade de 21 jours dans les exsudats stériles, par contre elle a été trouvée dans les exsudats non stériles.

Il faut remarquer l'abondance de la tyrosine seulement chez les deux espèces résistantes dans leurs exsudats non stériles (Tableau III). On pourrait voir là un indice d'une synthèse des composés aromatiques mais il s'agit d'une simple hypothèse.

D - Chromatographie des acides phénoliques sur couche mince de gel de silice (Kieselgel) -

1) Matériel et Méthodes :

a) Extraction :

Les exsudats de 120 plantules de chaque espèce sont filtrés et concentrés sous pression réduite à + 40°C jusqu'à 50 ml environ (KOVACS, 1970).

Nous avons extrait les matières grasses exsudées par les racines qui empêchent ou gênent la migration des composés phénoliques à l'aide d'éther de pétrole (DJAVADI, 1968), ensuite nous avons concentré pour chasser les traces d'éther de pétrole.

La solution aqueuse est acidifiée avec H_2SO_4 2N jusqu'à pH $\approx$ 1-2 puis extraite en continu pendant

14 heures avec de l'acétate d'éthyle; la phase organique est concentrée sous vide à + 40°C puis on reprend le résidu sec avec 0,2 ml de méthanol.

On dépose cette solution alcoolique sur les plaques pour identifier les acides phénoliques libres présents dans les exsudats (KOVACS, 1970). Pour libérer les acides phénols combinés, nous avons procédé à une hydrolyse de la phase aqueuse après avoir chassé les traces d'acétate d'éthyle sous pression réduite.

b) Hydrolyse acide de la phase aqueuse :

A la phase aqueuse on ajoute un volume égal de HCl 2N ; on effectue l'hydrolyse à reflux à 70°C pendant 1 heure (GUENZI, 1966) ensuite on laisse le produit refroidir ; le pH de l'hydrolysate est amené à 1-2 avec Ba (OH)₂ puis on centrifuge et on filtre et enfin on extrait à nouveau par l'acétate d'éthyle en continu pendant 14 heures ; la phase organique est traitée comme précédemment et la solution alcoolique est chromatographiée pour identifier les acides phénols combinés.

Le schéma résumant l'extraction est développé à la page suivante.

c) Préparation des plaques de gel de silice (Kieselgel) :

Nous avons utilisé le gel de silice G comme phase stationnaire car il donne la meilleure séparation pour les acides phénols.

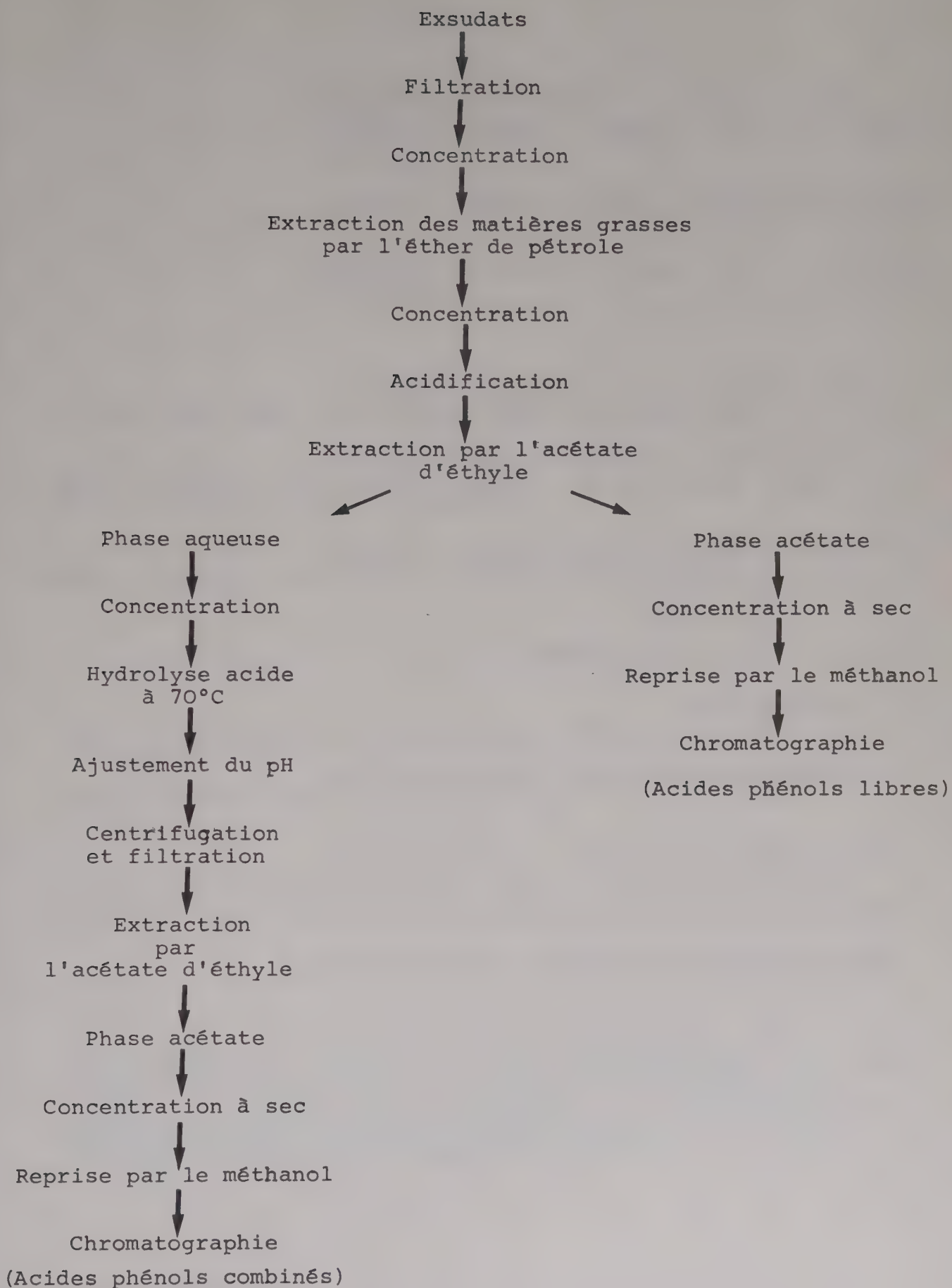
Avant le dépôt, les plaques sont activées à 105°C pendant 30 minutes.

d) Dépôts :

On dépose les extraits à 2cm du bord de la plaque et à 1,5cm d'intervalle.

e) Solvants et migration :

Nous avons employé les solvants suivants :



1. Chloroforme - méthanol (19 - 1 V/V)
2. Benzène - dioxane - acide (90 - 25 - 4 V/V)
acétique
3. Benzène - acide acétique - (125 - 72 - 3 V/V)
eau
4. Benzène - méthanol - acide (45 - 8 - 3 V/V)
acétique

Le temps de migration est à peu près de 1 heure avec tous les solvants pour une hauteur de 15cm.

Le solvant arrive au front; les plaques sont retirées soigneusement; ensuite, on les laisse sécher à l'air libre pendant 30 minutes.

Parmi les solvants utilisés, le benzène-acide acétique - eau donne la meilleure séparation.

f) Révélation :

Après séchage, les chromatogrammes sont observés à l'U.V.

Les réactifs utilisés en pulvérisation sont (LEDERER, 1959 et RANDERATH, 1965) :

1. P-nitro-aniline : composé d'un mélange de 2 ml de P-nitro-aniline à 0,5% dans HCl 2N, 8 ml d'acétate de sodium à 20% et 5 gouttes de nitrite de sodium à 10%. Les trois solutions doivent être mélangées juste avant l'emploi.

Le traitement des plaques avec ce mélange est suivi d'une pulvérisation avec du carbonate de sodium à 15%.

2. Chlorure ferrique à 0,2% dans l'eau : l'application de cette solution sur les chromatogrammes est suivie d'une pulvérisation avec une solution de ferricyanure de potassium à 1% dans l'eau ; les phénols qui réduisent le fer trivalent en bivalent peuvent être révélés par ce réactif (réaction au bleu Prusse) (RANDERATH, 1965).

3. Réactif spécifique de l'acide chlorogénique (KUC', 1956 et WILSON et coll. 1969).

On pulvérise les chromatogrammes avec une solution de nitrite de sodium 1% dans l'acide acétique 10%, ensuite on pulvérise de nouveau avec une solution de KOH ou Na OH N.

Le révélateur P-nitro-aniline donne des couleurs différentes avec les différents acides phénols (tableau V).

Le réactif 3 donne une tache colorée en orange brunâtre avec l'acide chlorogénique.

Le chlorure ferrique donne une tache colorée en rose avec l'acide salicylique.

g) Détermination quantitative :

La détermination directe sur plaque est facile et rapide par comparaison visuelle des taches, mais cette méthode est semi-quantitative et applicable uniquement en chromatographie unidimensionnelle aux produits parfaitement séparés.

Elle consiste à comparer visuellement la dimension et l'intensité de coloration de la tache à déterminer avec celles formées par une solution d'une substance témoin à concentration croissante connue (LEDERER, 1959). Les résultats sont présentés dans le tableau VI.

2) Résultats :

Dans les exsudats de 10 jours des trois espèces, nous avons identifié les acides libres suivants : P-coumarique, sinapique, férulique. Deux taches n'ont pas été identifiées ; elles sont caractérisées par leur RF : 0,93 et 0,97. De plus, l'acide chlorogénique a été trouvé chez les espèces résistante et semi-résistante tandis qu'il est absent chez la variété sensible. Nous n'avons pas identifié d'acides combinés chez les trois espèces pendant cette période. Au stade de 21 jours, l'acide P-coumarique a disparu des trois espèces, mais nous avons détecté l'acide gallique qui est plus concentré chez l'espèce résistante que chez les autres espèces (Tableau VII). L'acide chlorogénique

TABLEAU (V)

Coloration des acides phénols sous une lampe U.V. et en présence de P-nitro-aniline (P.N.A.)

Acide	U.V.		P.N.A.	Na ₂ CO ₃	RF
	254 nm	366 nm			
Chlorogénique	gris	gris	brun	brun gris	0,04
Gallique	gris	gris	brun jaunâtre	gris	0,25
P-coumarique	gris	-	orange	brun	0,75
Sinapique	bleu	bleu	brun	brun	0,80
Férulique	-	bleu	jaune brunâtre	brun	0,86
Non identifié	blanc	blanc	jaune orange	orange	0,93
Non identifié	blanc	blanc	jaune orange	orange	0,97

Les acides : vanillique, salicylique, syringique, gentisique, protocatéchique, P-OH benzoïque et caféique sont aussi examinés.

TABLEAU (VI)

Estimation des quantités d'acide chlorogénique et
d'acide gallique dans les exsudats de trois espèces
de Tomate en μM

Espèce	Jour		A. chlorogénique	A. gallique
Marmande	10	libre	-	-
		hydrolyse	-	-
	21	libre	40	1000
		hydrolyse	-	500
	50	libre	-	-
		hydrolyse	-	1000
<i>L. peruvianum</i>	10	libre	200	-
		hydrolyse	-	-
	21	libre	100	1000
		hydrolyse	-	500
	50	libre	-	-
		hydrolyse	-	1000
<i>L. hirsutum</i>	10	libre	700	-
		hydrolyse	-	-
	21	libre	200	1300
		hydrolyse	-	1000
	50	libre	-	-
		hydrolyse	400	1000

TABLEAU (VII)

Teneur en acides phénoliques libres dans les exsudats de trois espèces de Tomate.

Espèce	Age de la plante	Acide chlorogénique	Acide gallique	Acide P-coumarique	Acide sinapique	Acide férulique	* RF = 0,93	** RF = 0,97
Marmande	10 J.	-	-	+	+	+	+++	+++
	21 J.	Traces	+	-	+	+	++	+++
	50 J.	-	-	-	-	+	++	++
<i>L. peruvianum</i>	10 J.	+	-	+	+	+	+++	+++
	21 J.	+	+	-	+	+	++	+++
	50 J.	-	-	-	-	+	++	++
<i>L. hirsutum</i>	10 J.	+	-	+	+	+	+++	+++
	21 J.	++	++	-	+	+	++	++
	50 J.	-	-	-	-	+	++	++

+++ = Taches fortement colorées
 ++ = Taches moyennement colorées
 + = Taches faiblement colorées

* = Non identifié
 ** = Non identifié

a été identifié à ce stade en faible quantité chez la variété sensible tandis qu'il est plus abondant chez l'espèce résistante que chez l'espèce semi-résistante. (Tableau VII). L'hydrolyse acide à ce stade montre l'existence d'acide gallique qui est plus concentré chez l'espèce résistante que chez les autres espèces.

Au stade de 50 jours, les exsudats de trois espèces renferment seulement l'acide férulique et les deux taches non identifiées, mais l'hydrolyse des exsudats à cette période montre l'existence des acides gallique, sinapique, férulique et des deux acides non identifiés ; de plus, nous avons détecté l'acide chlorogénique uniquement chez l'espèce résistante (Tableau VIII).

3) Discussion :

La plupart des références disponibles dans la littérature sur les exsudats racinaires se rapportent à la libération des acides aminés et des sucres ; peu d'attention a été portée aux acides phénols.

VANCURA et coll. (1965) ont révélé six acides phénols dans les exsudats racinaires de Tomate, variété Imun, au premier stade de croissance, mais ne les ont pas identifiés ; au stade de fructification, un changement qualitatif est très remarquable. MENDEZ et coll. (1971) ont identifié chez la Tomate (Partie aérienne et racine) la présence d'acides vanillique, salicylique, P-OH benzoïque, syringique, férulique et P-OH cinnamique dans les cultures non stériles.

L'acide chlorogénique existe en quantité détectable dans les feuilles de Tomate (WAGGONER et coll. 1956).

Nos analyses mettent à jour la présence d'acide chlorogénique, gallique, P-coumarique, sinapique, férulique et deux autres acides non identifiés.

Les différences entre nos résultats et ceux d'autres auteurs s'expliquent par le fait que nous travaillons sur des matériels et dans des conditions expérimentales différents.

TABLEAU (VIII)

Teneur en acides phénoliques combinés

Espèce	Age de la plante	Acide chlorogénique	Acide gallique	Acide sinapique	Acide férulique	RF = 0,93	RF = 0,97
Marmade	10 J.	-	-	-	-	-	-
	21 J.	-	+	-	-	-	-
	50 J.	-	+	+	+	++	++
<i>L. peruvianum</i>	10 J.	-	-	-	-	-	-
	21 J.	-	+	-	-	-	-
	50 J.	-	+	+	+	++	++
<i>L. hirsutum</i>	10 J.	-	-	-	-	-	-
	21 J.	-	++	-	-	-	-
	50 J.	+	+	+	+	++	++

MENDEZ et coll. (1971) mentionnent que l'acide syringique peut être synthétisé à partir d'acide sinapique.

VANCURA et coll. (1965) ont remarqué que l'exsudation des acides phénols subit un changement qualitatif presque total chez la Tomate et le Poivron au cours de leur croissance. Des travaux ont été effectués sur l'analyse de différentes parties de certaines plantes en fonction de la sensibilité ou de la résistance vis-à-vis de leurs parasites.

Tous ces travaux concluent que les variétés résistantes sont plus riches en acide chlorogénique que les variétés sensibles (tableau ci-dessous) :

Plante hôte	Parasite	Partie de la plante	Auteurs
Tomate	Nématodes	Racines	PI et ROHDE, 1967
Coffea sp.	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Tissus	ECHANDI et coll., 1962
Cacao	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Tiges	CAPRILES et coll., 1966
Pomme de terre	<i>Streptomyces scabies</i>	Tubercules	LAWRENCE et coll., 1953 JOHNSON et coll., 1957
Pomme de terre	<i>Verticillium albo-atrum</i>	Racines	PATIL et coll., 1966 Mc LEAN et coll., 1961 LEE et coll., 1958
Pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>	Tubercules	SOKOLOVA et coll., 1960

DJAVADI et MANGENOT (1968) ont démontré que la quantité des composés phénoliques dans les exsudats de Cotonnier augmente avec la résistance à *Verticillium dahliae*.

Nos analyses révèlent que les exsudats de l'espèce résistante sont plus riches en acides chlorogénique et gallique que les exsudats de la variété sensible et ceux de l'espèce semi-résistante. Les travaux de Mc LEAN et coll. (1961) et BUXTON (1962) montrent que les composés phénoliques décroissent dans les racines avec l'âge des plantes. Il en est de même dans les exsudats racinaires des Tomates : les acides phénols libres diminuent au cours de la croissance végétative par contre, les acides combinés augmentent.

TROISIEME PARTIE

EFFET DES EXSUDATS ET DE LEURS
CONSTITUANTS SUR LA GERMINATION
DES CHLAMYDOSPORES, LA CROISSANCE
MYCELIENNE ET LES ACTIVITES
RESPIRATOIRES DE CELUI-CI

I - MATERIEL ET METHODES -

A - ISOLEMENT DE LA SOUCHE ETUDIEE -

Le champignon a été isolé à partir de racines malades (serres de St Max) par KHALIL (1971).

B - GERMINATION DES CHLAMYDOSPORES -

1) Préparation de la suspension mycélienne :

Nous avons utilisé des cultures de champignon en milieu de Czapek-Dox. Le mycélium est séparé du filtrat de culture, broyé dans 50 ml d'eau stérile dans le tube d'un homogénéiseur pendant 2 minutes.

La suspension est ensuite passée sur un tamis en acier inoxydable à mailles de 0,1 mm pour la débarrasser des gros fragments de mycélium. Puis elle est centrifugée pendant 20 minutes à 4 000 t/mn. Nous jetons le surnageant ; le mycélium au fond du tube est dilué de nouveau avec 10 ml d'eau distillée stérile. Toutes ces opérations sont conduites dans des conditions d'asepsie. Nous obtenons ainsi une suspension mycélienne homogène formée de filaments bien séparés les uns des autres et où les chlamydospores sont bien visibles et peuvent être comptées. La suspension est gardée à basse température jusqu'à son utilisation.

2) Méthode d'étude de la germination :

L'étude de la germination est faite sur des lames dans des boîtes de Pétri humides à raison d'une lame par boîte.

Une goutte de suspension de mycélium et une autre de la solution à étudier sont déposées sur les lames, les boîtes de Pétri sont mises dans l'étuve à 27°C ; l'examen microscopique est effectué à différentes périodes après dépôt d'une goutte de bleu d'aniline au lactophénol.

Dans quelques cas, nous avons étudié la germination sur des carrés de cellophane (1,5 x 1,5 cm) déposés à la surface d'un milieu gélosé auquel les substances à étudier ont été ajoutées. Ces substances peuvent diffuser à travers la cellophane qui est ensuite montée sur une lame dans une goutte de colorant pour l'observation.

Nous avons compté au hasard 10 champs microscopiques pour chaque lame ou carré de cellophane et calculé la moyenne. Nous procédons ainsi pour les 6 répétitions. Les chiffres donnés représentent la moyenne de ces répétitions.

C - ETUDE DE LA CROISSANCE -

1) Choix du milieu de culture :

Nous avons utilisé le milieu de base suivant, décrit par SHU-FUNG et LE TOURNEAU (1958) :

- Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g.
- KH ₂ PO ₄	1,5 g.
- Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 mg.
- Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,1 mg.
- Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	0,1 mg.
- MoONa ₂	0,02mg.
- Mn SO ₄ H ₂ O	0,02mg.
- Glucose	30 g.
- H ₂ O distillée	1000 ml

pH = 4,8

Le glucose a été choisi comme source de carbone car il existe dans les exsudats des trois espèces et il donne le meilleur pourcentage de germination pour *Pyrenochaeta lycopersici*.

Nous avons utilisé différentes sources d'azote à raison de 0,42 g. d'N/l. (Asparagine, Arginine, Tyrosine et $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$).

L'asparagine et l'arginine donnent des pourcentages de germination très élevés à la concentration de 0,4 g. d'N/l. (KHALIL, 1973).

Parmi les sources azotées utilisées, l'asparagine donne les meilleurs résultats (Tableau IX). C'est pourquoi nous l'avons utilisée comme source d'N dans nos travaux sur l'action des acides phénols. La croissance est optimale au bout de 15 jours.

TABLEAU (IX)

Poids sec de mycélium en mg

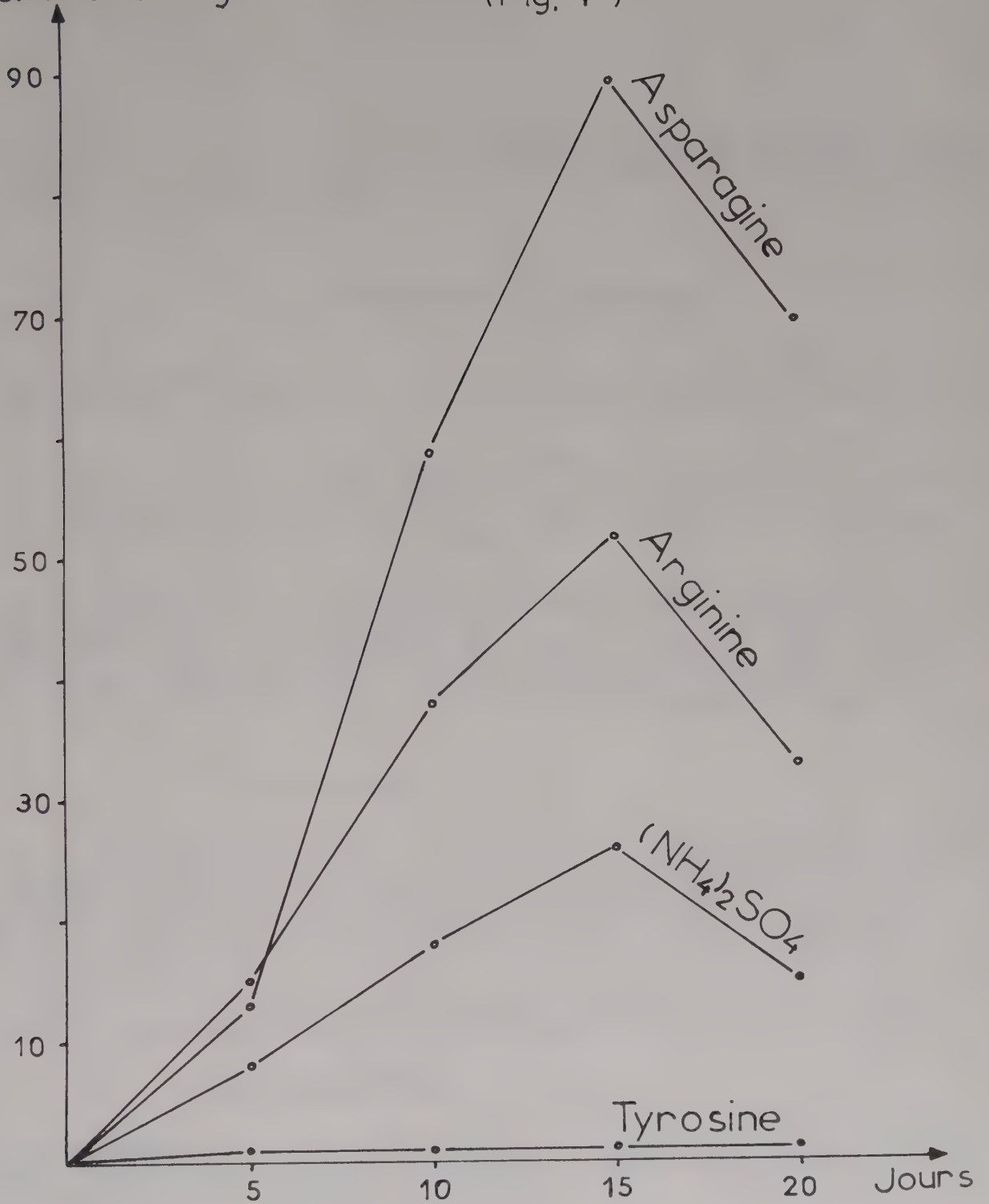
Source d'N Jour	Asparagine	Arginine	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	Tyrosine
5ème	12,8	14,8	8	0,9
10ème	59,3	38	17,7	0,9
15ème	90	52	26	0,88
20ème	70	33	15	0,9

2) Croissance linéaire :

Nous avons préparé le milieu de base gélosé (1,5 g% agar-agar) auquel les substances à étudier ont été ajoutées ; ensuite le milieu est stérilisé à 105°C pendant 15 minutes, coulé en boîte de Pétri à raison de 20 ml/boîte. Les boîtes sont inoculées par des disques de mycélium (diamètre : 0,5 cm) d'une culture de 15 jours à raison d'un disque par boîte. Ces boîtes sont placées dans l'étuve à 27°C pendant 15 jours.

Poids sec en mg.

(Fig. 4)



Croissance du mycélium en présence
de différentes sources d'N.

A la fin, nous avons mesuré le diamètre des colonies du champignon ; les chiffres donnés représentent la moyenne de 6 répétitions.

3) Production de mycélium :

La production de mycélium a été effectuée en culture liquide dans les mêmes milieux que ci-dessus.

Les cultures sont faites dans des fioles de 150 ml à raison de 50 ml/ fiole, inoculées par des disques de champignon (un disque 0,5 cm/ fiole) prélevés sur toute la surface d'une culture de 15 jours.

Les fioles sont mises dans l'agitateur à la température du laboratoire (20° - 23°C, 90 oscillations/mn, amplitude 6 cm). Les cultures ont duré 15 jours ; après cette période, le mycélium est filtré, lavé plusieurs fois à l'eau distillée ensuite séché à l'étuve à 105°C pendant 14 heures.

D - RESPIROMETRIE -

La vitesse de consommation d'oxygène en μ l par heure/mg poids sec de mycélium a été déterminée en atmosphère normale, en présence de différentes concentrations d'acide chlorogénique et d'acide gallique, par la technique manométrique différentielle (respiromètre Gilson) (UMBREIT et coll., 1959).

Les mesures sont effectuées à 27°C. Chaque fiole à réaction (de Warburg) contient :

- cavité principale :

2 ml d'une suspension de mycélium préparé comme suit : le champignon est cultivé en milieu liquide dans des fioles de 150 ml contenant 50 ml de milieu de base, stérilisées à 105°C pendant 15 minutes.

Les fioles sont inoculées par des disques de 0,5 cm, ensuite mises sur l'agitateur pendant une semaine où le mycélium se développe très activement.

Le mycélium d'une fiole est lavé plusieurs fois à l'eau distillée stérile puis broyé aseptiquement dans 50 ml de milieu de base frais ; nous avons fait 4 répétitions pour chaque concentration et l'expérience a été répétée deux fois.

- ampoule latérale :

0,2 ml de la solution de la substance à étudier de façon à obtenir la concentration convenable en produit actif après addition à la suspension mycélienne.

- cavité centrale :

0,2 ml de KOH 20% dans laquelle plonge un rectangle de papier Whatman n° 1 plissé. Après l'équilibrage de la température, la substance à étudier est versée dans la cavité principale : c'est le temps zéro de l'expérience.

II - RESULTATS -

Les exsudats racinaires agissent sur les micro-organismes de la rhizosphère ; certains stimulent la germination des propagules et leur croissance ultérieure alors que d'autres peuvent les inhiber.

L'activité de micro-organismes antagonistes peut également inhiber le développement de l'inoculum dans le sol. Ceci constitue un exemple de limitation biologique naturelle des agents pathogènes, souvent dénommée fongistase du sol.

Certains de ces effets fongistatiques peuvent être supprimés par les exsudats racinaires.

Les exsudats racinaires de Tomate lèvent la fongistase de *Pyrenochaeta lycopersici*. Ainsi la germination des chlamydospores et le développement du champignon sont stimulés et par conséquent le taux de contamination augmente aggravant ainsi la maladie. C'est pourquoi nous avons étudié l'action des exsudats et de certains de leurs constituants sur la germination des chlamydospores, la croissance du mycélium et l'activité respiratoire de ce dernier.

A - EFFET DES EXSUDATS SUR LA GERMINATION -

Nous avons préparé une solution d'exsudats racinaires de chaque espèce à 0,3g dans 100 ml d'eau distillée : cette concentration correspond à la concentration du liquide de culture.

L'étude de la germination a été réalisée sur des carrés de cellophane, comme décrit précédemment. Nous avons stérilisé ces solutions d'exsudats sur membrane Millipore.

La germination des chlamydospores en présence de différents exsudats est présentée dans le tableau X. Ce tableau , avec les figures 5, 6 et 7 montrent que :

1. En présence des exsudats de 21 jours, le taux de germination est plus élevé pendant les premières heures de l'expérience que dans ceux de 10 et 50 jours ; en général, les chlamydospores ont besoin de 8 heures pour commencer à germer.

2. La germination est plus importante en présence des exsudats de 10 et 21 jours de Marmande qu'en présence de ceux de *L. peruvianum* et de *L. hirsutum*.

3. En présence des exsudats de 50 jours de *L. peruvianum*, le taux de germination augmente, au bout de 48 heures, autant qu'en présence de ceux de Marmande, tandis qu'il ne varie pas aux trois périodes chez ce dernier et chez *L. hirsutum* (Fig. 8).

Conclusions :

Il y a des différences entre les effets des exsudats racinaires de 3 espèces étudiées. Ces effets pourraient-ils être expliqués par la présence des acides phénols en particulier les acides chlorogénique et gallique ?

C'est pourquoi nous avons étudié l'action de ces substances.

TABLEAU X

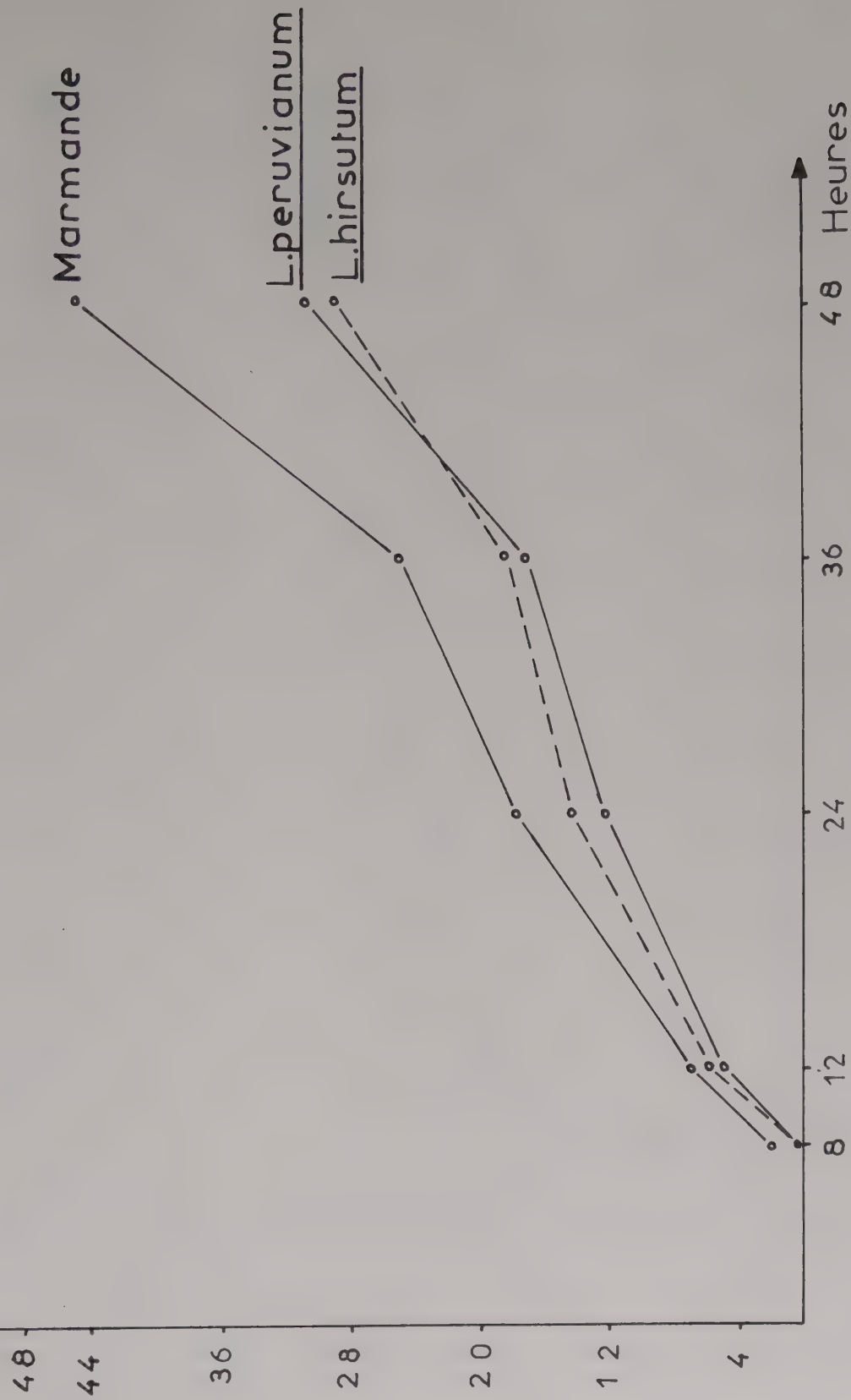
Germination des chlamydospores en présence des exsudats de 10, 21 et 50 jours de trois espèces de Tomate

Espèce	Age des Exsudats	Temps de germination / heures				
		8	12	24	36	48
Marmande	10	3,6	13,5	34	47	85
	21	27	44	52	64	87
	50	8	13,5	34	59	87
<i>L. peruvianum</i>	10	1	9,7	23	33	59
	21	12	38	44	50	61
	50	17	21	41	51	82
<i>L. hirsutum</i>	10	1	11	27	34	55
	21	14	38	41	53	56
	50	8	13	27	41	59
Témoin	H ₂ O	2	10	11	22	30
	Glucose-asparagine					100

Les chiffres donnés sont calculés en fonction de la valeur du témoin (52,5%) (glucose-asparagine) ramenée à 100.

% de germination.

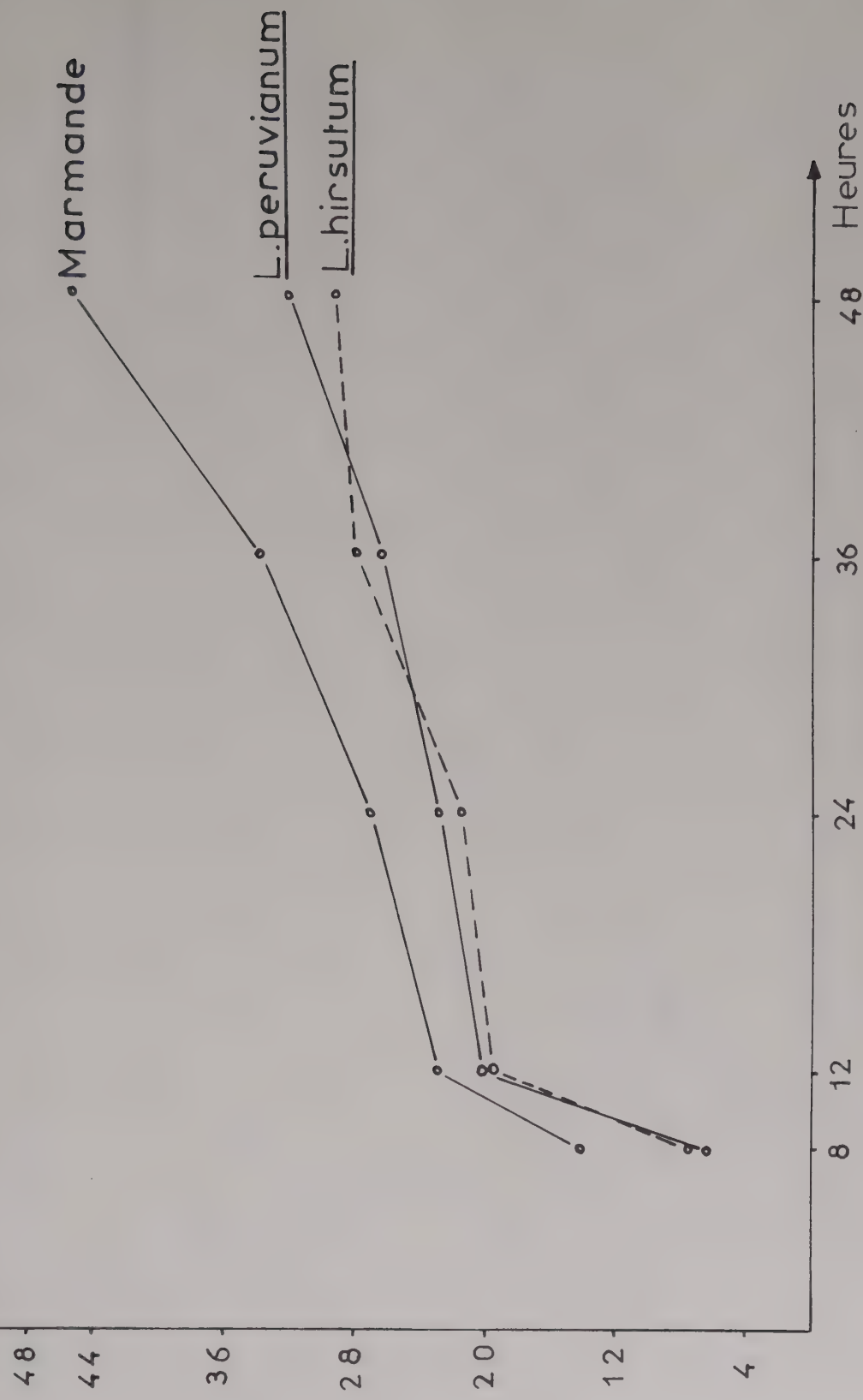
(Fig. 5)



Germination des chlamydozoospores en présence des exsudats
de 10 jours.

%. de germination.

(Fig. 6)

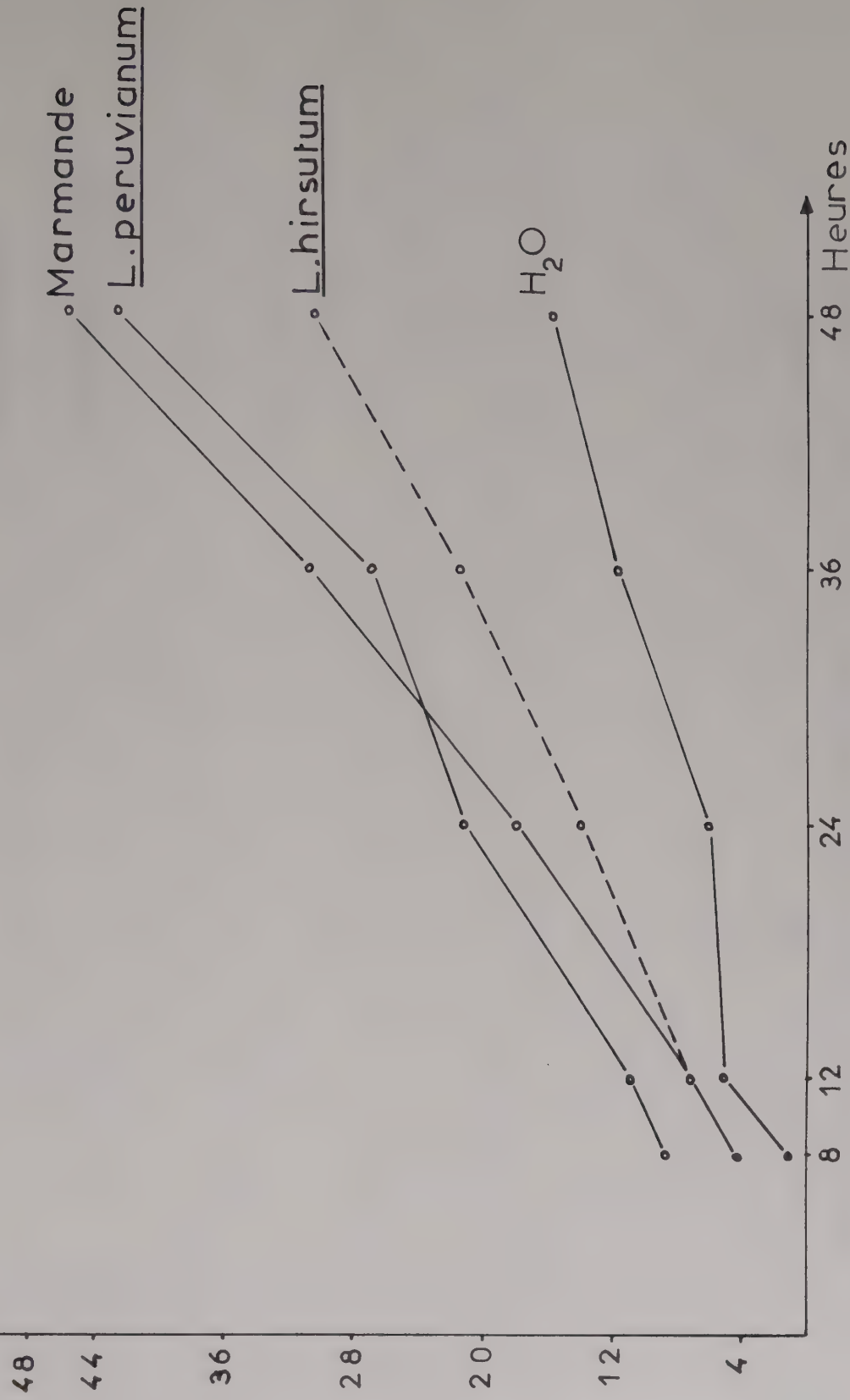


Germination des chlamydospores en présence des exsudats

de 21 jours.

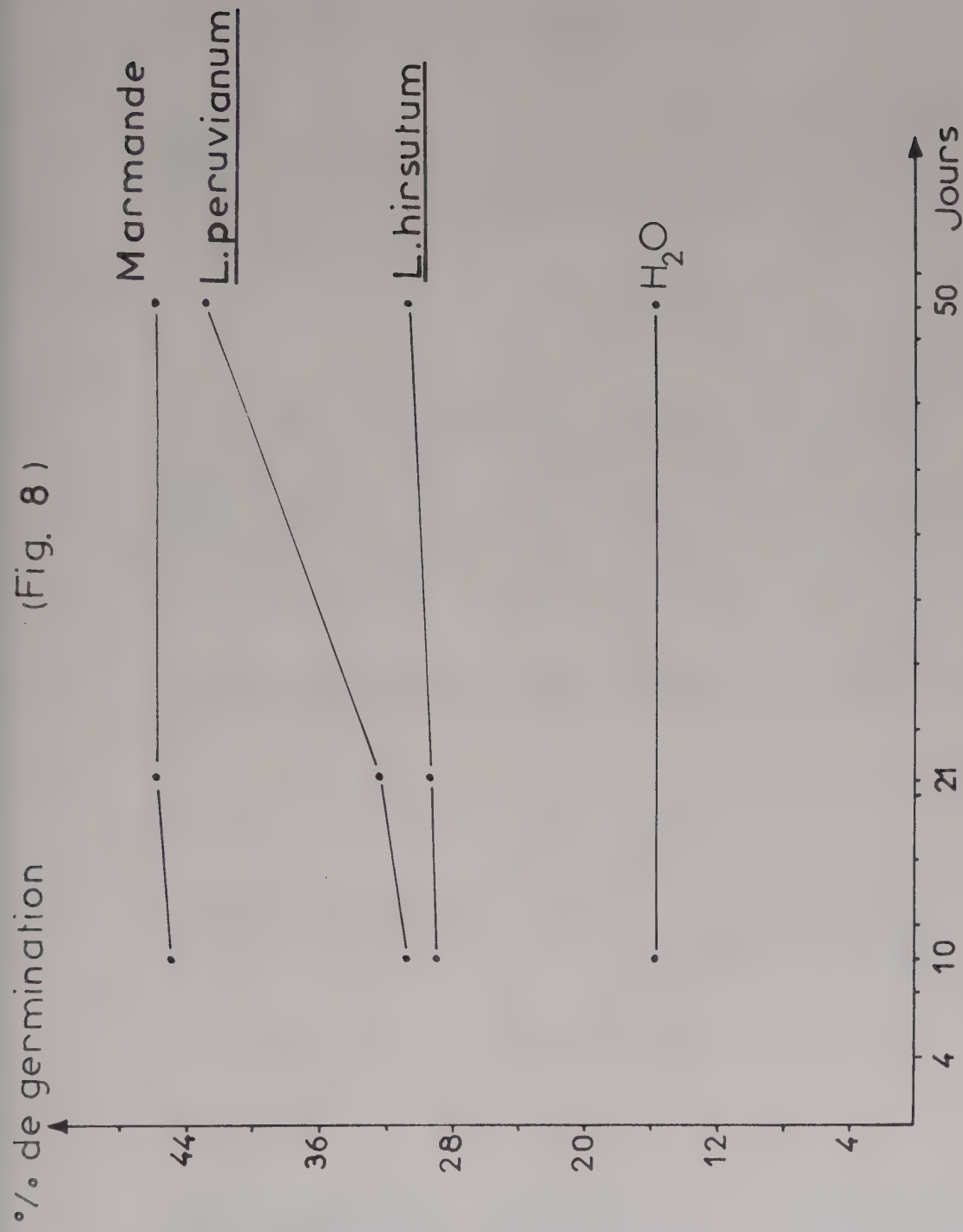
%.de germination.

(Fig. 7)



Germination des chlamydospores en présence des exsudats
de 50 jours.

(Fig. 8)



Germination des chlamydospores en présence des
exsudats de 10, 21 et 50 jours au bout de 48 heures.

B - EFFET DES ACIDES PHENOLS -

On a souvent étudié la participation éventuelle des composés phénoliques aux phénomènes de résistance ; nous ne pouvons donc pas négliger le rôle de ces substances. Cependant, d'une manière générale, l'influence des composés aromatiques de la plante saine est contestée.

1. Sur la germination :

Nous avons étudié l'action des acides chlorogénique et gallique sur la germination des chlamydospores en présence de milieu de base gélosé, additionné de glucose (0,3g/ 100 ml) et d'asparagine (0,012g N %), pour atteindre un rapport C/N = 10, valeur donnant le meilleur pourcentage de germination (KHALIL, 1973). Nous avons choisi, pour nos expériences, des concentrations de ces deux substances proches de celles trouvées dans les exsudats (Tableau VIII).

L'effet de l'acide chlorogénique et de l'acide gallique et de leur mélange à différentes concentrations est présenté dans le tableau XI ; nous constatons que :

- l'acide chlorogénique à la dose la plus faible est sans action. Tous les autres traitements ont un effet dépressif sur la germination.

- Avec les concentrations les plus fortes, correspondant aux quantités estimées dans les exsudats d'espèces résistantes, le taux de germination est diminué de moins de 40%. Ceci n'est pas négligeable mais ne suffit pas pour expliquer seul le comportement variétal.

Nous allons voir quelle est l'action de ces composés sur la croissance du parasite.

2. Sur la croissance :

Nous avons étudié l'action des acides chlorogénique et gallique sur la croissance (croissance linéaire et production de mycélium) avec les mêmes concentrations que dans le cas de la germination,

TABLEAU XI

% de germination des chlamydospores en présence de
différentes concentrations des acides chlorogénique et
gallique au bout de 48h,

Ch. μ M G. μ M	0	44	177	708
0	52,5	51,2	39	39,9
83	40,3	34,3		38,5
332	38,9		34	32,6
1328	36,2	38,5	37,8	32

Ch. = acide chlorogénique

G. = acide gallique

ppds 5% = 6,70

ppds 1% = 8,91

en présence de milieu de base riche, c'est-à-dire 30g. de glucose et 0,42 g N d'asparagine par litre et en présence de milieu pauvre : 3 g de glucose et 0,12 g. N d'asparagine par litre.

Les tableaux (XII, XIII) montrent les résultats en milieu riche ; nous remarquons que :

1. Toutes les concentrations d'acide chlorogénique sont sans effet en milieu solide, alors que l'acide gallique ralentit faiblement l'élongation du mycélium.

2. En milieu liquide, la croissance est légèrement stimulée par les doses les plus faibles d'acide chlorogénique. Par contre, elle est diminuée en présence d'acide gallique particulièrement aux plus fortes concentrations.

Les tableaux (XIV, XV) montrent les résultats en milieu pauvre ; on remarque que :

3. Toutes les concentrations des acides chlorogénique et gallique ont un effet relativement favorable sur milieu solide.

4. En milieu liquide, la croissance est peu modifiée ; elle n'est certainement pas inhibée de façon significative.

3. Sur la respiration :

Nous venons de voir que les deux acides chlorogénique et gallique, seuls ou en combinaison, ont peu d'effet sur la germination et ne ralentissent pas la croissance végétative. DJAVADI (1968) avait observé des anomalies dans la respiration de *Verticillium dahliae* en présence des exsudats de Cotonnier résistant et de la scopolétine, Il voyait là le signe de désordres physiologiques capables peut-être d'affaiblir l'agent pathogène. Nous avons donc étudié l'influence des acides chlorogénique et gallique sur la respiration de *Pyrenochaeta lycopersici*. La consommation d'O₂ est due à la respiration du micro-organisme, mais dans les conditions présentes, elle peut correspondre aussi à l'auto-oxydation des phénols ou à leur oxydation par les enzymes du champignon.

TABLEAU (XII)

Ø de colonie (cm) en présence de différentes concentrations
des acides chlorogénique et gallique au bout de 48 h.
(30 g de glucose et 0,42 g N d'asparagine par litre)

Ch. μM G. μM	0	44	177	708
0	$6,2 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,09$	$6,2 \pm 0,1$
83	$5,3 \pm 0,1$			
332	$5,5 \pm 0,06$			
1328	$5,9 \pm 0,1$			

TABLEAU (XIII)

Poids sec de mycélium (mg) en présence des acides chlorogénique
et gallique pendant 15 jours
(30 g de glucose et 0,42 g N d'asparagine par litre)

Ch. μ M G. μ M	0	44	177	708
0	135,2	162,9	146,4	138,5
83	116,5			
332	92,7			
1328	88,9			

ppds 5% = 2,96

ppds 1% = 3,98

TABLEAU (XIV)

Ø de colonie (cm) en présence des acides chlorogénique et
gallique au bout de 48 h.
(3 g de glucose et 0,12 g N d'asparagine par litre)

Ch. μM G. μM	0	44	177	708
0	5,5 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,1	6 $\pm$ 0,08	6 $\pm$ 0,2
83	6 $\pm$ 0,08	5,4 $\pm$ 0,2		6,6 $\pm$ 0,2
332	6 $\pm$ 0,2		6,5 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1
1328	6,2 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,2

TABLEAU (XV)

Poids sec de mycélium (mg) en présence des acides chlorogénique
et gallique pendant 15 jours
(3 g de glucose et 0,12 g N d'asparagine par litre)

Ch. μ M G. μ M	0	44	177	708
0	55,3	63,3	61,4	60,5
83	60,2	56,8		64,3
332	57,2		57,2	64,3
1328	57,3	61,5	60,5	60,2

ppds 5% = 4,88

ppds 1% = 6,512

Nous avons mesuré la vitesse de consommation d'O₂ en présence des mêmes concentrations que celles étudiées dans le cas de la germination et de la croissance.

Le milieu de base contient 30 g de glucose et 0,42 g N d'asparagine par litre. Les solutions à étudier sont stérilisées sur membrane Millipore.

Le tableau XVI et les figures 9 et 10 montrent que :

1. La consommation d'O₂ augmente progressivement avec le temps (11 heures).

2. A toutes les concentrations étudiées, l'acide chlorogénique ne montre aucun effet tandis qu'on constate une diminution des quantités d'O₂ consommé en présence d'acide gallique, plus particulièrement avec les doses les plus fortes.

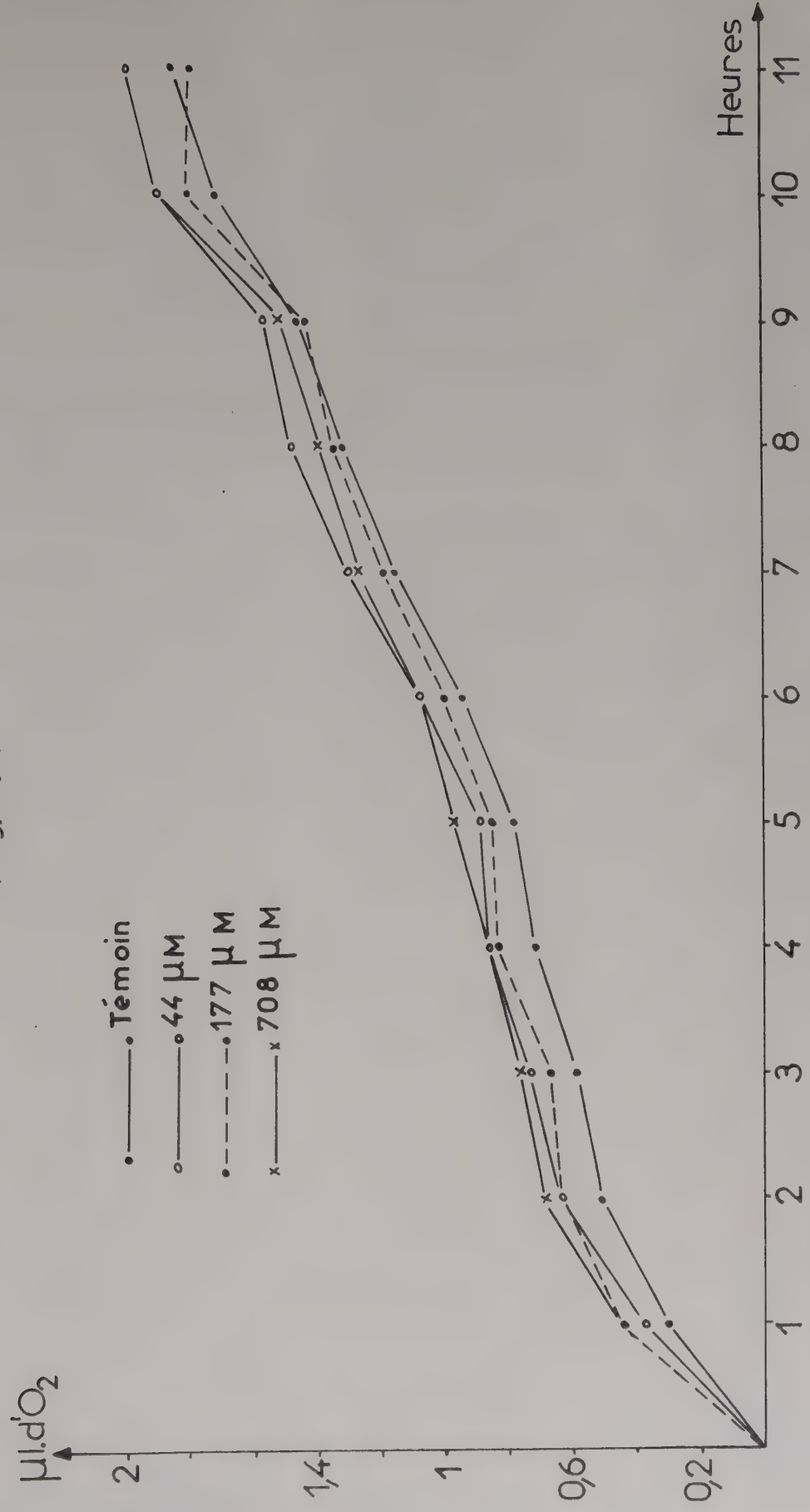
TABLEAU (XVI)

μl d'O₂/h/mg de mycélium sec

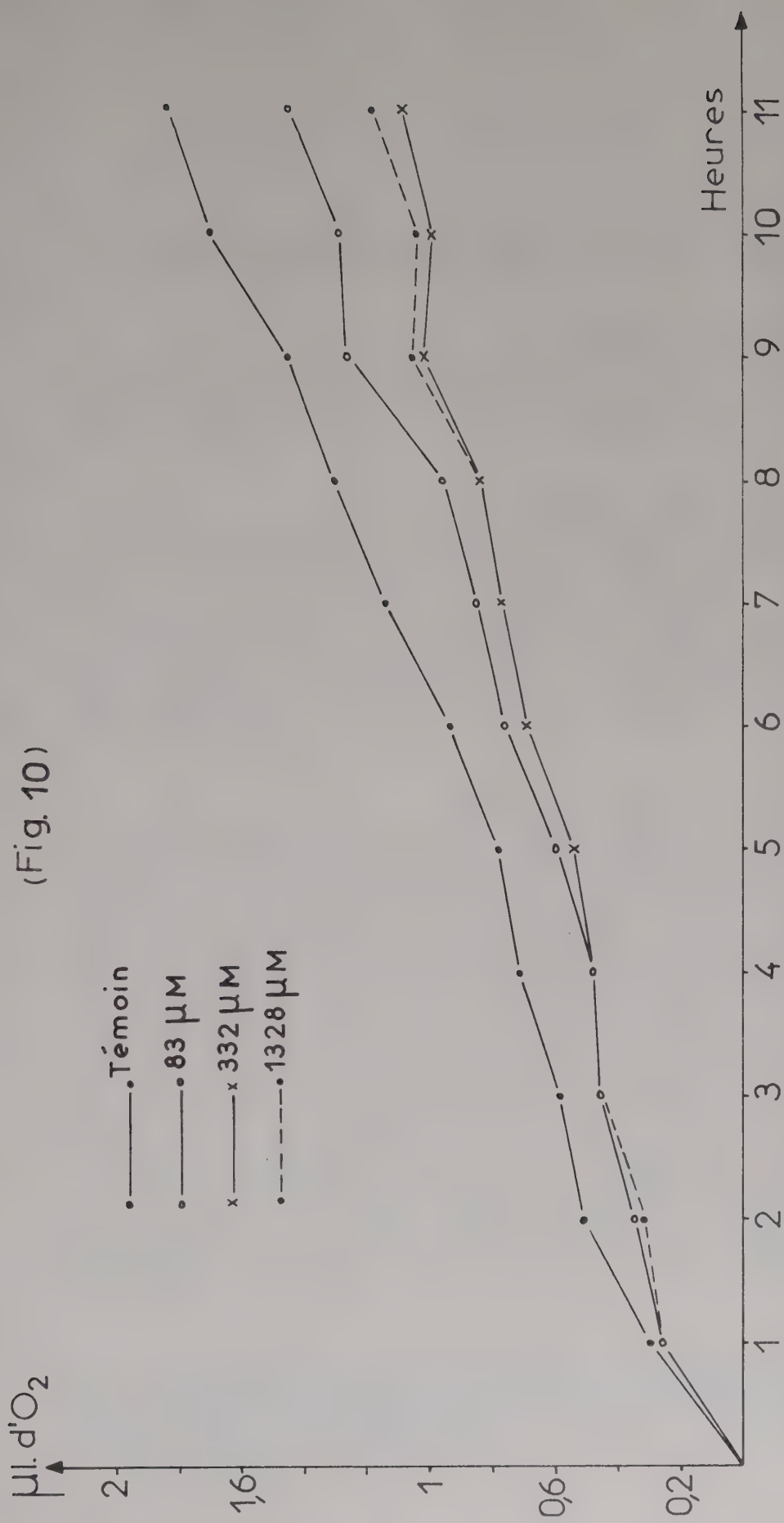
μM H.	Acide chlorogénique										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Témoin	0,3	0,51	0,59	0,72	0,79	0,95	1,16	1,32	1,47	1,72	1,86
44	0,37	0,63	0,73	0,86	0,89	1,08	1,3	1,48	1,57	1,9	2
177	0,44	0,62	0,67	0,83	0,85	1	1,19	1,34	1,44	1,81	1,8
708	0,45	0,68	0,75	0,85	0,97	1,07	1,27	1,4	1,52	1,9	2

	Acide gallique										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
83	0,26	0,35	0,46	0,48	0,6	0,77	0,86	0,97	1,28	1,3	1,47
332	0,26	0,34	0,46	0,48	0,55	0,7	0,78	0,85	1,03	1	1,1
1328	0,27	0,32	0,46	0,48	0,55	0,7	0,78	0,86	1,07	1,05	1,2

(Fig. 9)



Consommation d' O_2 par mg. du mycélium sec en présence de différentes concentrations d'acide chlorogénique.



Consommation d' O_2 par mg. du mycélium sec en présence de différentes concentrations d'acide gallique.

C - Effet de la fraction cationique sur la germination des chlamydospores :

LAWRENCE et coll. (1963) ont trouvé que la fraction cationique des exsudats racinaires de Tomate est la plus stimulante pour la germination des conidies et des microsclérotés de *Verticillium albo-atrum*.

Nos analyses montrent que les exsudats de la variété sensible sont plus riches en acides aminés que ceux de l'espèce résistante ; chez l'espèce semi-résistante, qui devient sensible avec l'âge, la teneur en ces substances augmente fortement au cours de 50 jours ; de plus, les exsudats de cette espèce à ce stade stimulent la germination des chlamydospores autant que ceux de la variété sensible , c'est pourquoi nous avons pensé étudier l'action de cette fraction sur la germination des chlamydospores.

Nous avons fait passer des quantités égales de solutions à 0,12 g pour 100 ml d'exsudats de 50 jours de la variété Marmande et de *L. hirsutum* sur la colonne cationique précédente. Les deux éluats sont concentrés à sec sous pression réduite à + 40°C, puis les résidus secs (fractions cationiques) sont croisés, c'est-à-dire que celui de la variété Marmande a été ajouté au liquide effluent (qui a traversé la colonne) de *L. hirsutum* et inversement celui de *L. hirsutum* a été ajouté au liquide effluent de la variété Marmande, ensuite le volume est réduit à 40 ml (concentration égale au liquide de culture) et ainsi nous avons préparé des exsudats de la variété Marmande où la fraction cationique représente celle de *L. hirsutum* et des exsudats de *L. hirsutum* où sa fraction cationique représente celle de la variété Marmande. De même, nous avons ajouté de l'acide chlorogénique (400µM) aux exsudats de la variété Marmande pour nous rapprocher le plus possible de la composition en acides phénols de l'exsudat de *L. hirsutum*.

Les exsudats modifiés sont stérilisés sur Millipore, ensuite l'étude de la germination est réalisée comme précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau XVII.

TABLEAU (XVII)

% de germination des chlamydospores au bout de 48 H.

Tampon pH 4,8	H ₂ O	S	S-R	R	S'	R'	S + Ch
17,4	15,8	46,1	43	30,8	29,2	44,4	40,1

ppds 5% : 2,1

ppds 1% : 2,8

Tampon : 1. $\frac{1}{25}$ mol. KH₂PO₄, soit 5,445 g/litre

2. $\frac{N}{5}$ NaOH, soit 8g/litre

3. On ajoute goutte à goutte à 100 ml de 1.,
un volume de 2 nécessaire pour obtenir le pH 4,8.

S : Exsudats de la variété Marmande

S' : Exsudats modifiés de la variété Marmande

R : Exsudats de *L. hirsutum*.

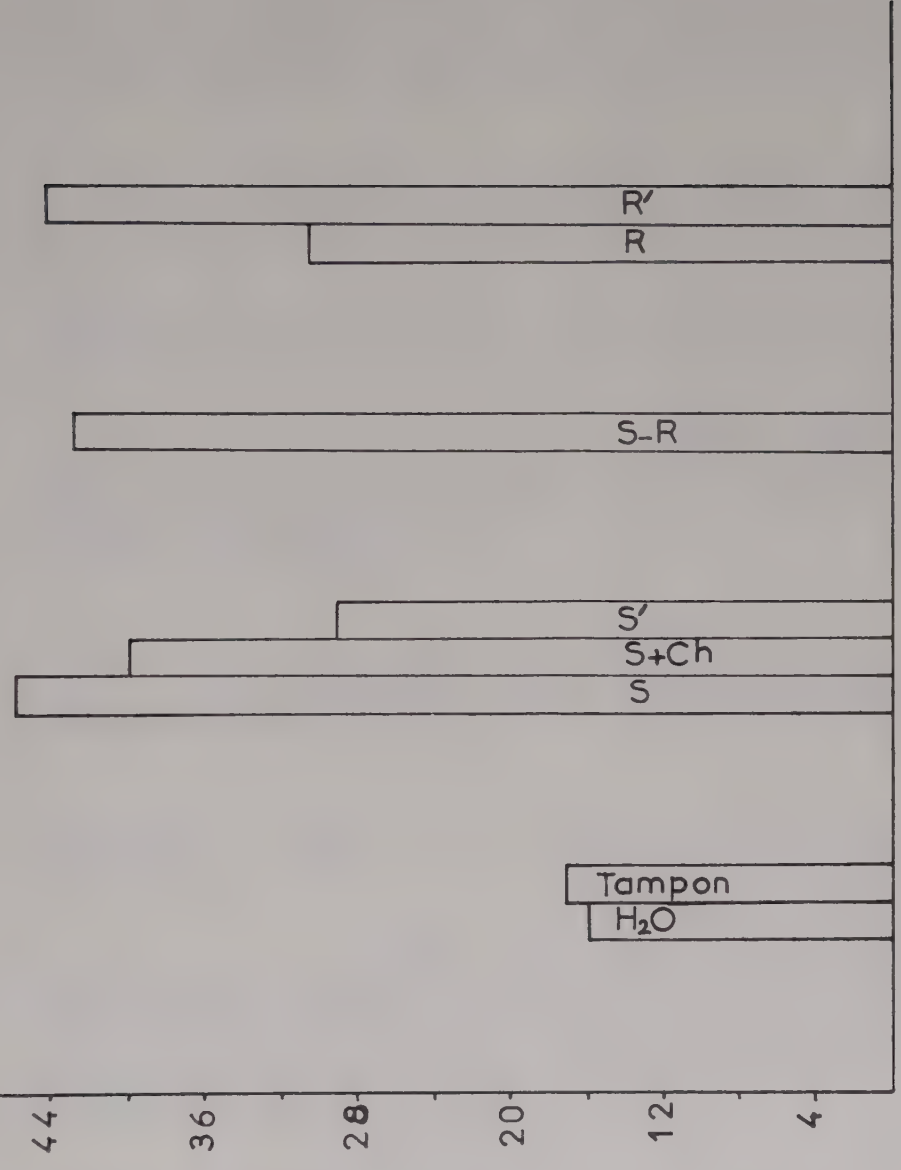
R' : Exsudats modifiés de *L. hirsutum*

S-R : Exsudats de *L. peruvianum*.

Ch : Acide chlorogénique

°/° de germination.

(Fig. 11)



Germination des chlamydospores en présence
des exsudats modifiés de 50 jours. (48 h)

Nous remarquons que :

1. Les exsudats modifiés de *L. hirsutum* (R') ont une action du même ordre que celle des exsudats de la variété Marmande (S) ; par contre, les exsudats modifiés de la variété Marmande (S') ont un effet comparable à ceux de *L. hirsutum* (R).

2. L'acide chlorogénique ajouté aux exsudats de la variété Marmande a un effet faible.

Conclusion : L'effet des acides phénols n'est pas à négliger mais il ne suffit pas pour expliquer les influences inégalement stimulantes des deux exsudats.

Le rôle des fractions cationiques est beaucoup plus marqué. Comme elles diffèrent l'une de l'autre, à la fois quantitativement et qualitativement, nous devons étudier d'abord l'influence de la concentration en N aminé.

D - Influence de la teneur en N aminé sur la croissance de *P. lycopersici* -

A 50 jours, les exsudats de la variété sensible renferment 4 fois plus d'N aminé que ceux de *L. hirsutum*.

Nous avons donc préparé, dans le milieu de base, des solutions d'acides aminés correspondant exactement à la fraction cationique de la variété Marmande (S) et à celle de *L. hirsutum* mais quatre fois plus concentrées (R x 4). De plus, par dilution au 1/4, nous avons préparé les solutions S/4 et R.

D'autre part, nous avons opéré à deux concentrations différentes en glucose : 30 g% et 3g% ; au total huit traitements ont été réalisés ; les résultats sont figurés dans le tableau de la page suivante.

Le pH final a été mesuré en milieu liquide : il varie de 4,6 à 4,9.

		S	R x 4	S/4	R
Croissance linéaire	glucose 30	6,5 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,1	5,9 ± 0,2
	glucose 3	6,3 ± 0,2	5,9 ± 0,2	5,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2
Croissance pondérale	glucose 30	53,5 ± 2,6	41,9 ± 2,7	34 ± 2,3	16,2 ± 0,6
	glucose 3	37,5 ± 1,4	29,9 ± 0,7	17,7 ± 0,6	13 ± 1,8

On peut en tirer les remarques suivantes :

- sur milieu solide, les différences observées sont faibles. On peut noter seulement que, en présence de glucose abondant, la croissance linéaire est améliorée en S par rapport à R x 4. En milieu pauvre en sucre, S/4 est plus favorable que R.

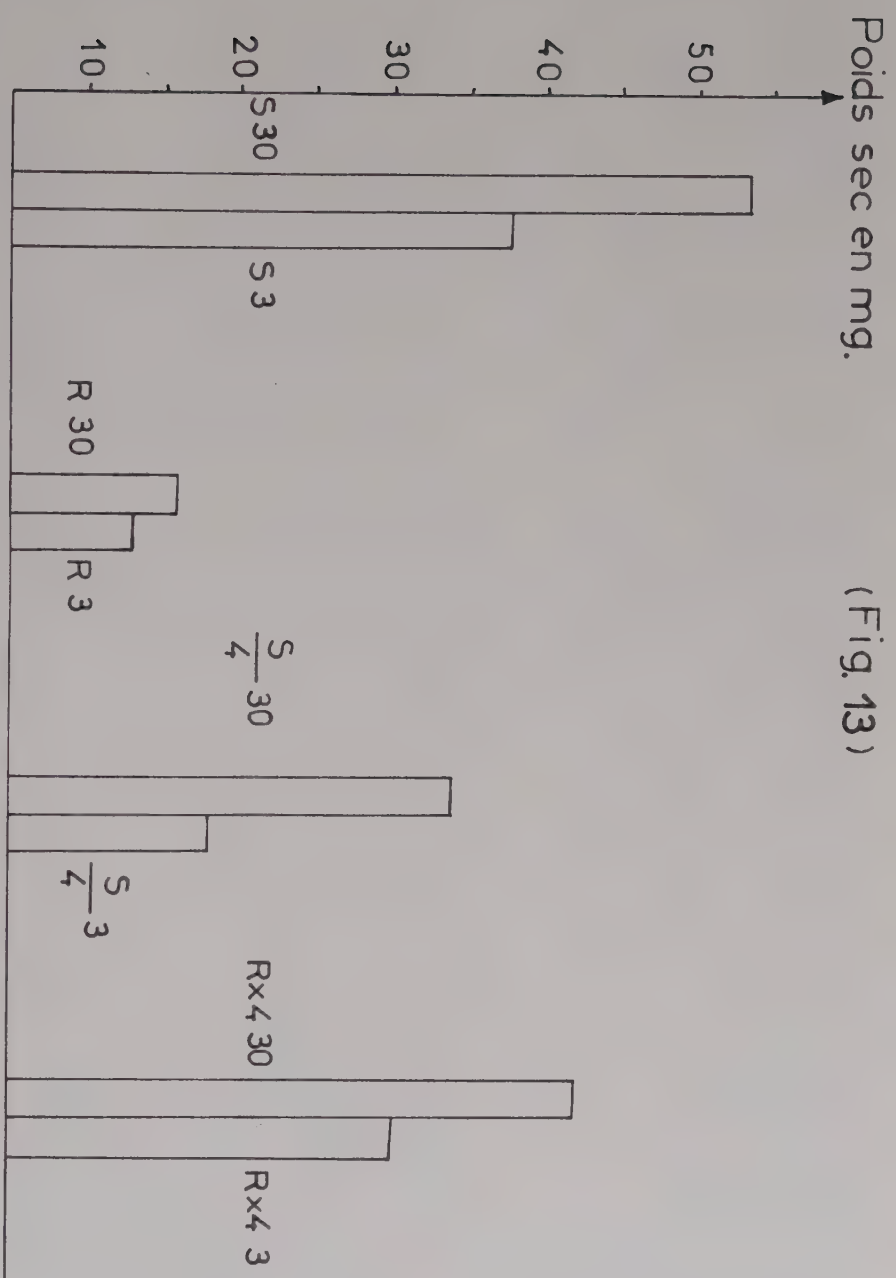
- dans le milieu liquide, la teneur en glucose de 3‰ est toujours limitante sauf peut-être sur R où la croissance est limitée par un autre facteur.

Quand on diminue le taux d'N total chez la variété sensible, c'est-à-dire quand on passe de S à S/4, la production mycélienne reste plus élevée qu'en présence de R (Fig. 13). Par contre, quand on augmente la concentration en N de R à R x 4, la production mycélienne est moins élevée qu'en S.

Nous pouvons en conclure :

1. La richesse en N aminé des exsudats de Marmande explique en partie l'effet stimulant de ceux-ci.

2. Elle n'explique pas entièrement les différences d'action des exsudats des deux espèces. Leurs compositions qualitatives interviennent aussi. Cela peut s'expliquer soit par la présence, chez Marmande, de substances stimulantes, soit par l'existence chez *L. hirsutum* de substances inhibitrices. Pour tenter de répondre à ces questions, il faut, de préférence, travailler dans des conditions où le glucose n'est pas limitant. D'autre part, on peut supposer l'existence d'interactions entre acides aminés du point de vue de leur métabolisme. Nous avons donc, d'abord, travaillé dans des milieux complexes simulant les



Croissance du mycélium en présence de différentes sources d'N (15 jours)

S = Source d'N représentée par les acides aminés identifiés chez Marmande au stade de 50 jours.

S/4 = S dilué 4 fois.

R = Source d'N représentée par les acides aminés identifiés chez *L. hirsutum*. au stade de 50 jours.

R x 4 = Valeur de R multipliée par 4.

30 et 3 = Concentrations de glucose par litre.

Planche III

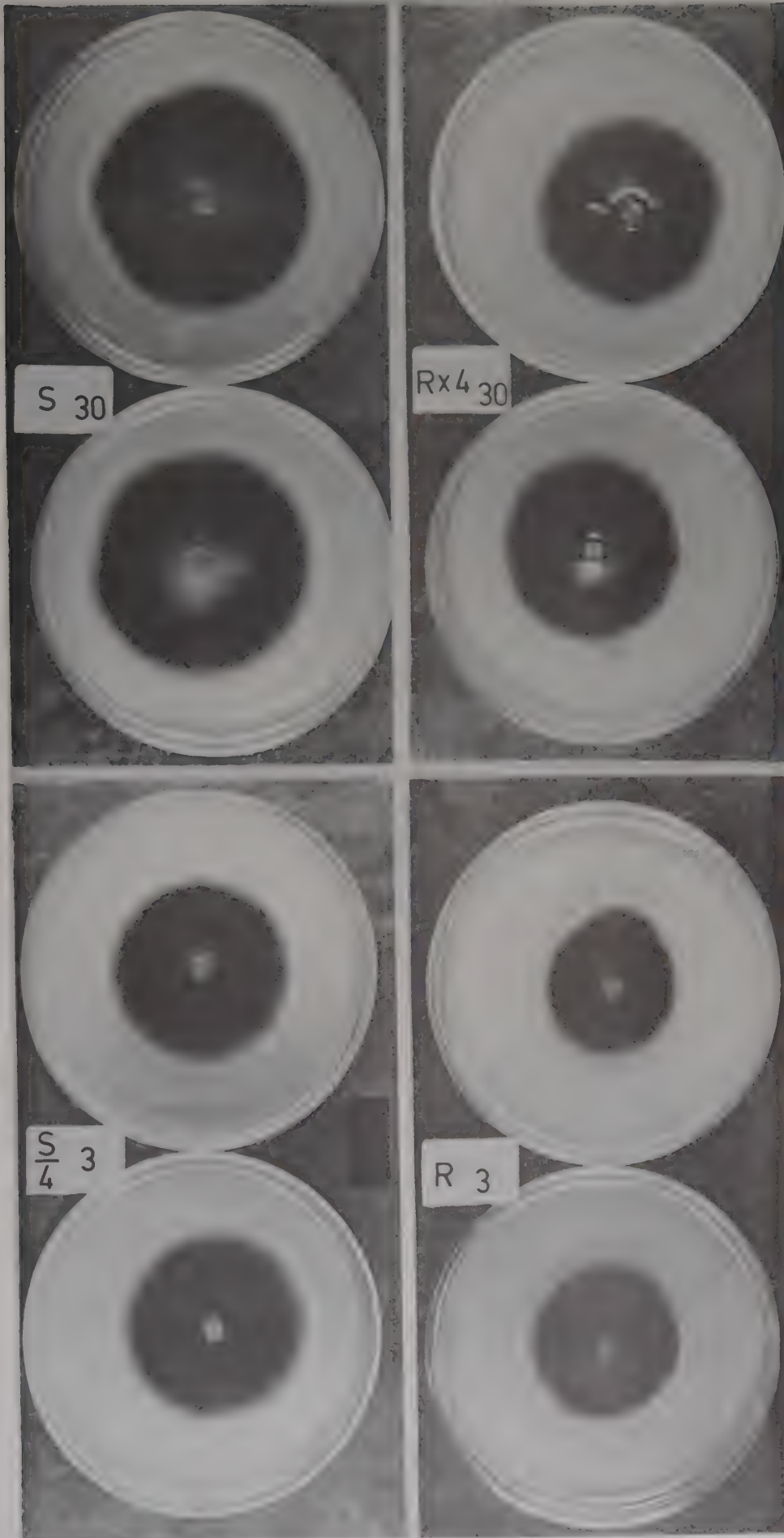


Planche IV



Planche V



fractions cationiques mais où nous faisons varier un ou plusieurs acides aminés.

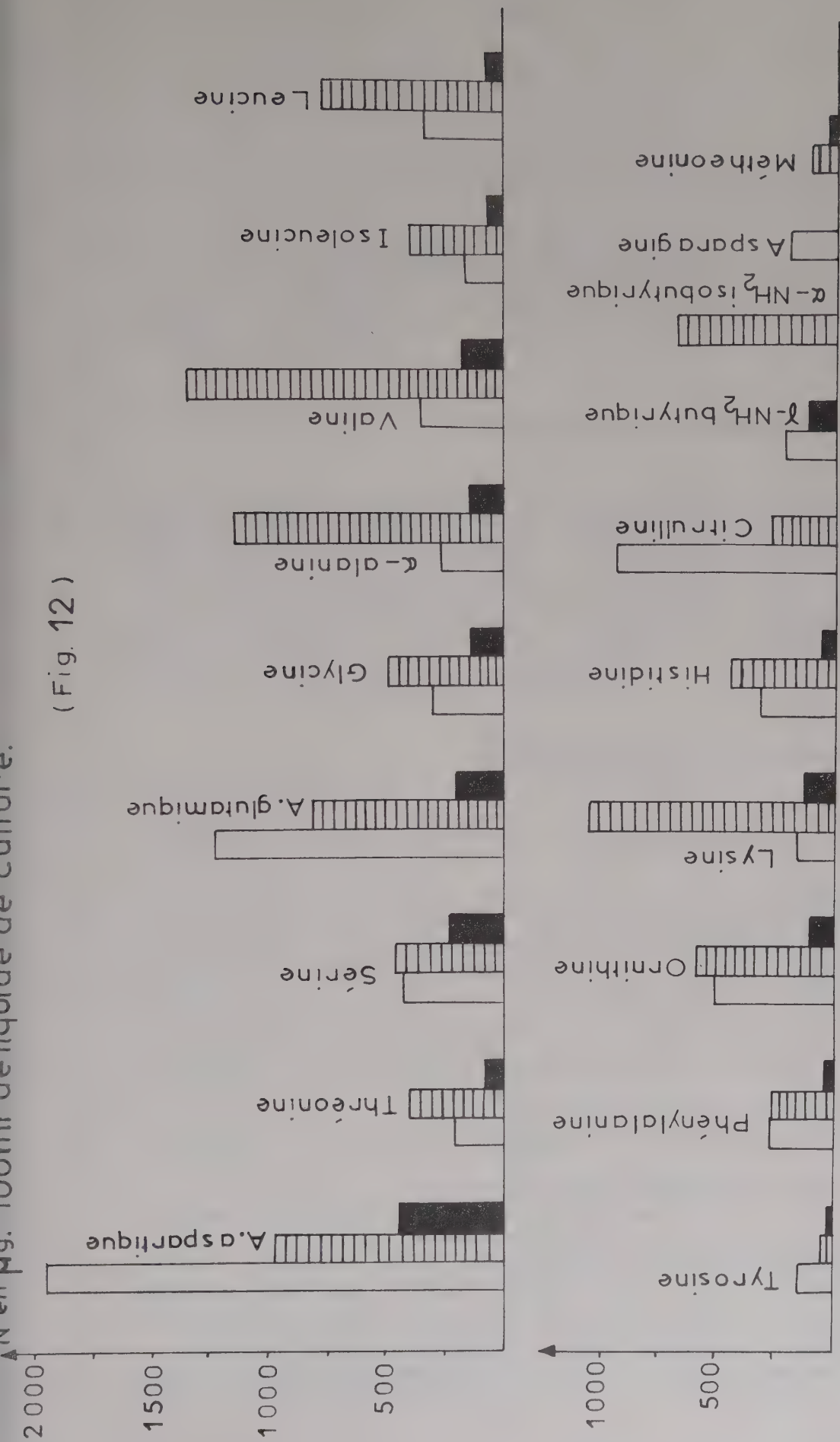
E - Influence des acides aminés :

Nous avons rapporté, Tableau IV, la composition des exsudats en acides aminés. Nous indiquons ci-dessous la répartition de ceux-ci, exprimée en N pour 100 d'N aminé total.

Acides	S	R	Acides	S	R
Asp	24,2	22,6	Ser	5,3	<u>11,0</u>
Asn	2,6	-	Gly	3,6	<u>6,8</u>
Met	-	1,6	Cys	-	0,7
Lys	2,0	<u>6,2</u>			
Thr	2,7	3,0	Ala	3,2	<u>6,9</u>
Ileu	2,0	2,6	Val	4,3	<u>9,0</u>
			Leu	4,2	3,2
Glu	<u>15,5</u>	9,7			
Gln	-	-	Tyr	<u>1,9</u>	0,8
Pro	-	-	Phe	<u>3,5</u>	1,7
Orn	6,4	5,4			
Cit	<u>11,9</u>	0	His	<u>4,1</u>	2,8
Arg	Traces	0	γ -NH ₂ butyr.	2,7	<u>5,6</u>

On voit que la teneur relative en acide aspartique et ses dérivés est peu différente dans les exsudats à l'exception de la lysine. Au contraire, la famille du glutamate est mieux représentée dans les exsudats de Marmande qui contiennent seuls de la citrulline.

(Fig. 12)



Acides aminés chez les trois espèces au stade 50 jours.

□ Marmande ▨ L. peruvianum ■ L. hirsutum

Inversement la sérine, l'alanine et leurs dérivés sont plus abondants chez *L. hirsutum*.

On note encore une teneur deux fois plus élevée en acides aminés aromatiques chez la variété sensible. Les pourcentages sont faibles, mais comme ces substances participent au métabolisme des phénols, nous n'avons pas cru pouvoir les négliger.

1 - Recherche des constituants stimulants :

Etant donné ce qui précède, nous nous sommes adressés à l'acide glutamique, à la citrulline et à la phénylalanine. Nous avons comparé leur action à celle de l'acide aspartique. Enfin, nous avons inclus dans nos essais l'asparagine et l'arginine dont on connaît par ailleurs l'action favorable sur la germination de *P. lycopersici* soumis à la fongistase (KHALIL, 1973). De plus, l'arginine a été signalée dans les exsudats de Marmande en conditions non axéniques.

a) Influence sur la germination de
P. lycopersici:

exp. 1. : Préparation de l'exsudat synthétique :

Les acides aminés non sélectionnés pour notre étude sont apportés en quantités correspondant à la moyenne de leur concentration dans les exsudats des deux espèces. Ils sont dissous dans le milieu de base à 3 g de glucose/litre. On ajoute à des fractions aliquotes de cet exsudat synthétique, 1, 2 ou 3 acides aminés sélectionnés, en quantités correspondant à leur concentration dans les exsudats de la variété Marmande ou de *L. hirsutum*.

De plus, certaines fioles reçoivent en outre de l'acide chlorogénique à concentration finale 400 µM.

Les conditions expérimentales (pH, température) sont les mêmes que précédemment.

La composition des différents milieux est résumée avec les résultats dans le Tableau XVIII.

exp. 2 : Pour compenser les différences de teneur en N total rencontrées dans l'expérience 1, nous avons

repris le même travail, mais en ajustant la concentration finale en N à $8000\mu\text{g}/100\text{ ml}$ par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Les milieux étudiés et les résultats sont également indiqués dans le Tableau XVIII.

Conclusions :

Le sulfate d'ammonium est très peu favorable à la germination (17,3%) et les résultats des deux expériences sont très voisins. Leur interprétation demande de la prudence puisque les concentrations en N aminé sont variables.

On peut cependant en tirer des indications utiles :

- comme prévu, l'acide chlorogénique a une action très faible, en général non significative.

- pour des teneurs en N aminé total du même ordre ($2\ 500$ à $2\ 800\mu\text{g}/100\text{ ml}$), les substances sélectionnées peuvent se classer dans l'ordre suivant quant à leur effet favorable sur la germination : Asp (21%) < Phe < Glu < Asn < Asp + Phe. Cet effet stimulant de la phénylalanine se retrouve avec l'acide glutamique (SGP 40%, S Glu 31%) comme avec les fortes doses d'acide aspartique (SAP 38%, S Asp 29,5%). Une autre association favorable est représentée par acide glutamique - acide aspartique (R Asp 21%, RAG 35,9%) et la phénylalanine n'a alors plus d'effet (SAG 41%, SAGP 41%, RAG 35,5%, RAGP 32%).

La citrulline apparaît, enfin, comme un substrat très favorable supérieur à l'acide glutamique. L'un et l'autre en combinaison donnent des taux de germination supérieurs à 40% quelle que soit la teneur en N total. De plus, la citrulline paraît être le seul acide aminé permettant au champignon de répondre à un apport d' N-NH_3 (S Cit E₂).

- L'effet de la dose d'N aminé est variable, tantôt faible (S Asp - R Asp, S Glu - R Glu), tantôt plus marqué.

Les pourcentages de germination sont toujours beaucoup plus faibles que sur milieu glucose-asparagine à 120 mg N/litre (cf. P. 47).

TABLEAU XVIII Influence des acides aminés sur la germination des chlamydospores.

Composition du milieu (F ₁)																	% de germination																
	S.Asp	R.Asp	S.Glu	R.Glu	S.Phe	R.Phe	S.Cit	S.Asn	S.AG	R.AG	S.AP	R.AP	S.AC	S.AGP	R.AGP	S.AGC	S.GP	S.GC	S.PC														
L(+)/Asp	1940	453	—	—	—	—	—	—	1940	453	1940	453	1940	—	453	1940	—	—	—														
L(+)/Glu	—	—	1242	195	—	—	—	—	1242	195	—	—	—	—	1242	195	1242	1242	—														
DL.Phe	—	—	—	—	278	34	—	—	—	—	278	34	—	—	34	—	278	—	278														
L.Cit	—	—	—	—	—	—	956	—	—	—	—	—	956	—	—	956	—	956	956														
L.Asn	—	—	—	—	—	—	—	205	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—														
N	4284	2797	3586	2539	2622	2378	3300	2549	5526	2992	4562	2831	5240	5804	3026	6482	3864	4542	3578														
E ₁	-Ch	25	21	30,2	27,9	25,2	22,7	33	41,3	35,9	34,8	32,2	43,7	40,9	32,4	44,7	—	—	—														
	+Ch	—	20,7	—	25,4	—	21,6	28,5	—	35,2	—	33,2	38,1	—	33	36	—	—	—														
	E ₂	29,5	—	31,4	—	27,2	—	418	41,4	—	38,3	—	44,3	—	—	—	40,2	43,8	41,4														

E₁ = Le milieu de culture est constitué de milieu de base (glucose 0,3 g%) additionné d'acides aminés : DL-Thr 137 + D-Sér 317 + Gly 214 + L (+) Ala 199 + L (+) Val 261 + L (+) Ileu 106 = L Leu 199 + L (-) Tyr 84 + L (+) Orn 310 + L (+) Lys 143 + L (-) His 192 + γ-NH₂ butyr 163 + DL Mét 16 + L (-) Cys 3,5 en µg d'N /100 ml (total = 2344 µg d'N) et des acides aminés étudiés aux concentrations indiquées ci-dessus.

E₂ = Le milieu de culture est constitué de milieu de base (glucose 0,3 g%) additionné des acides aminés étudiés aux mêmes concentrations que dans le Tableau XVIII. La teneur totale est N est ajustée à 8 000 µg/100 ml par addition des quantités nécessaires d' (NH₄)₂ SO₄. Le témoin est représenté par le milieu de base (glucose 0,3 g%) additionné de 8 000 µg N/100 ml sous forme d' (NH₄)₂ SO₄.

Ch = Acide chlorogénique.

persici : b) Influence sur la croissance de *P. lyco-*

Le milieu témoin (R) est une solution dans le milieu de base des acides aminés présents dans l'exsudat de *L. hirsutum* (2 000 µg N/100 ml) additionnés de 3 g de glucose/100 ml.

Les traitements sont représentés par cette même solution d'acides aminés, diluée 2 fois et recevant 1 000 µg N/100 ml sous forme de l'acide aminé étudié. La teneur en glucose reste de 3 g/100 ml.

Les préparations sont gélosées ou non, ajustées à pH 4,8 et stérilisées comme à l'habitude. Le temps d'incubation est de 15 jours.

Nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau suivant :

Influence des acides aminés sur la croissance de *P. lycopersici* :

	Témoin					
	R	R/2	Cit	Arg	Asp	Glu
Croissance linéaire cm	5,6±0,02	4,6±0,01	5,8±0,01	6 ±0,1	6,2±0,1	6,1±0,1
Croissance pondérale mg	18 ±0,5	11,3±0,7	47,3±2,4	42,4±1,7	38,2±1,5	51,7±1,6
pH final	4,6	4,8	4,7	4,4	4,4	5,1

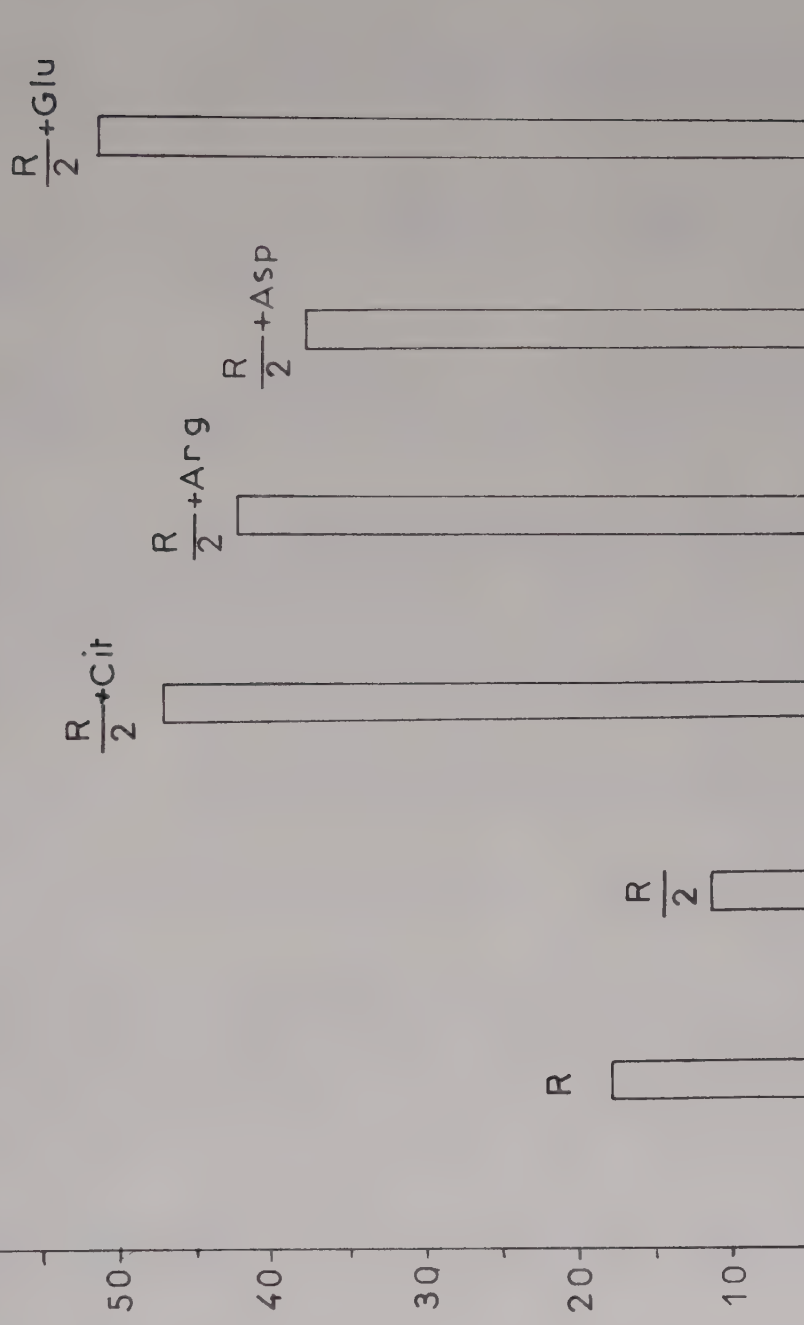
Conclusion :

1. Sur milieu solide, le diamètre des colonies varie peu si le taux d'N est constant. Il n'y a aucune différence significative selon les résultats.

2. En milieu liquide, les meilleurs résultats sont obtenus avec la citrulline et surtout l'acide glutamique. L'arginine bien que moins favorable est supérieure à l'acide aspartique (Fig. 14).

Poids sec en mg.

(Fig. 14)



Croissance du mycélium en présence de différentes sources d'N (15 jours).

c) Influence de certains acides aminés, seuls ou en combinaison, sur la croissance pondérale de *P. lycopersici* :

Le champignon est cultivé sur le milieu de base additionné de glucose (3 g/100ml) et d'un ou plusieurs acides aminés à une concentration totale correspondant à 1 000 µg d'N/100 ml.

Nous avons envisagé les acides aspartique et glutamique, l'asparagine ainsi que la lysine relativement abondante dans les exsudats de *L. hirsutum* et l'ornithine en raison de sa parenté avec la citrulline.

D'autre part, on a signalé parfois une action inhibitrice de la méthionine et de la cystéine sur la croissance des champignons et nous avons étudié ces deux substances en association avec l'acide glutamique sans modifier la teneur totale en N. A titre de témoin, nous avons inclus dans la série, l'acide glutamique à 500µg N/100 ml.

Après 15 jours, les mycéliums sont pesés. Les résultats sont remis dans le tableau suivant :

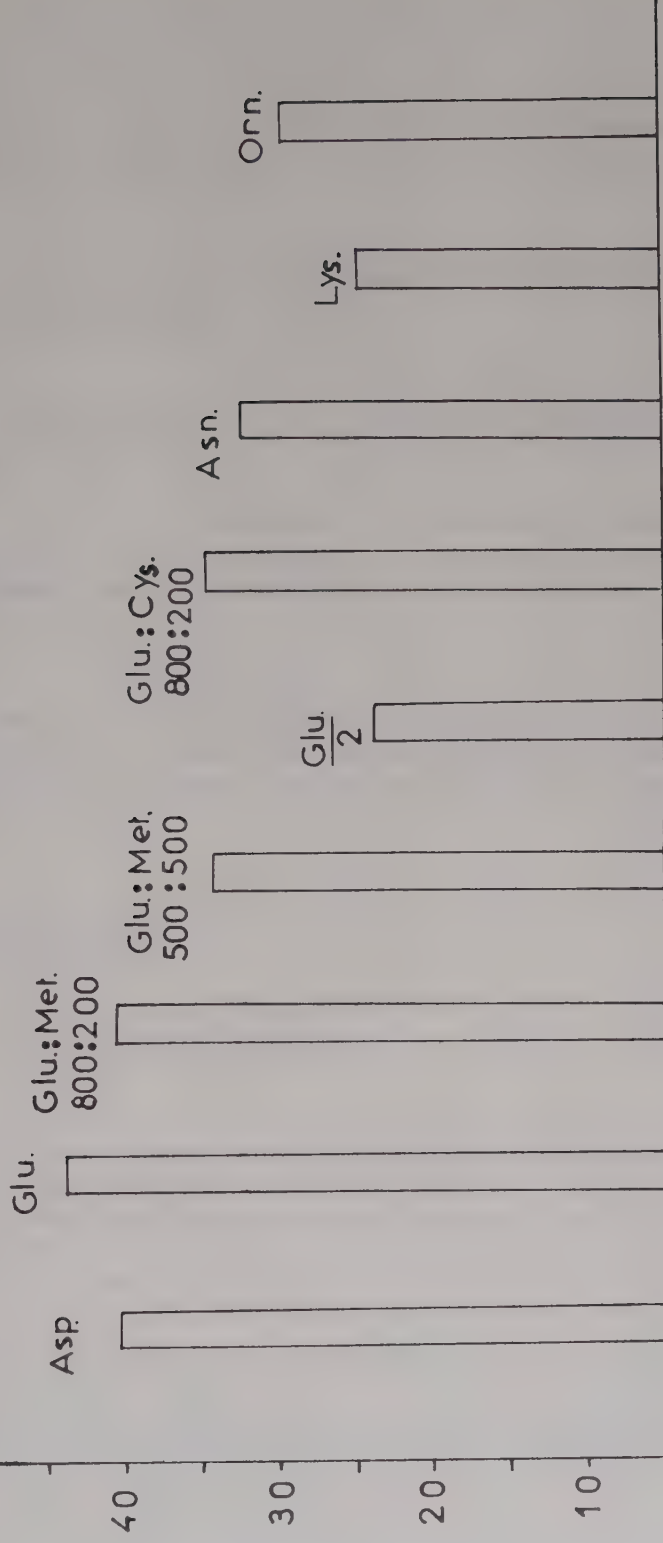
Poids sec de mycélium (mg) pendant 15 jours

	Asp	Glu	Glu+Mét 800:200	Glu + Mét 500 : 500	Glu + Cys 800 : 200	1/2 Glu	Asn	Lys	Orn
	40,6 ± 1,4	44,1 ± 0,9	40,8 ± 2,3	34,5 ± 1,1	34,9 ± 2,2	24,1 ± 0,8	32,5 ± 1,8	25,2 ± 1,5	30,4 ± 4,6
pH final	5,1	5,2	5,1	4,9	5,1	5	4,5	4,5	4,6

Conclusion :

L'acide glutamique se montre le plus favorable puis l'acide aspartique, tandis que l'asparagine, l'ornithine et surtout la lysine sont de moins bons nutriments.

Poids sec en mg. (Fig. 15)



Croissance du mycélium en présence de différentes sources d'N (15 jours)

L'effet des deux premières substances est conforme aux résultats des expériences précédentes et l'action de la lysine est à rapprocher de l'influence des exsudats de *L. hirsutum*.

Le comportement de l'ornithine est plus difficile à comprendre puisque c'est l'intermédiaire entre deux substances très favorables.

D'autre part, méthionine et cystine sont moins bien utilisées que l'acide glutamique mais ne paraissent pas avoir d'effet toxique, du moins en présence de glutamate.

On aurait pu étudier encore l'utilisation de la sérine, de la valine, du glyocolle et de l'alanine qui représentent ensemble plus du tiers de l'N aminé des exsudats de *L. hirsutum*.

En fait, les problèmes posés par l'influence de la fraction cationique sur la germination et la croissance de *P. lycopersici* sont très complexes et pourraient faire l'objet d'études beaucoup plus approfondies.

III - DISCUSSION -

A - Effet des exsudats -

Les exsudats racinaires jouent un rôle très important dans la rhizosphère, car ils influencent les micro-organismes soit pathogènes soit saprophytes ; certains sont inhibés et d'autres sont stimulés dans leur croissance (ROVIRA, 1962).

Au cours de la germination des graines et pendant la croissance des plantules, des quantités considérables de substances sont libérées et par conséquent l'activité microbienne dans la rhizosphère augmente ; certaines substances sont spécifiques pour certains micro-organismes tandis que d'autres ne sont pas spécifiques (SINGH, 1964).

Plusieurs auteurs ont étudié l'influence des exsudats racinaires des différentes espèces végétales résistantes et sensibles vis-à-vis de certains parasites ; tous les résultats indiquent que les exsudats des variétés sensibles stimulent la germination des propagules des pathogènes, par

contre ceux des variétés résistantes l'inhibent ou sont beaucoup moins stimulantes (BUXTON, 1957 et 1958 ; TURNER, 1970 et KRAFT et coll., 1970).

KHALIL (1970) a montré que la germination des chlamydospores de *P. lycopersici* est favorisée par les exsudats non stériles de la variété sensible de Tomate ; elle n'a pas remarqué des différences de germination pendant les stades 10 , 21 et 50 jours ; il en est de même pour l'espèce résistante dont les exsudats paraissent inhibiteurs de la germination. Nos résultats concordent bien avec ceux qui précèdent ; les exsudats de la variété sensible stimulent la germination des chlamydospores tandis que ceux de l'espèce résistante sont défavorables ; l'action des exsudats de la variété Marmande ne varie pas pendant les trois stades, il en est de même pour *L. hirsutum* résistante.

En présence des exsudats de *L. peruvianum* semi-résistante, la germination est stimulée au stade de 50 jours et ceci est en accord avec les observations de BESRI (1970) qui a montré que cette espèce n'est attaquée qu'à un stade de développement assez avancé.

Les différents pourcentages de germination en présence des exsudats des espèces étudiées ici peuvent être expliqués par les variations de la composition de ces exsudats ; pourtant, l'action inhibitrice ou stimulante de ceux-ci vis-à-vis du parasite ne peut être la seule cause de la résistance ou de la sensibilité à la maladie des différentes espèces de Tomate. En effet, le parasite pénètre même dans les racines de l'espèce résistante malgré l'action de leurs exsudats ; la plante met alors en oeuvre d'autres mécanismes pour empêcher l'invasion du pathogène (DELON, 1972).

B - Effet des acides phénols -

Les composés phénoliques des plantes saines, notamment l'acide chlorogénique, ne sont pas toxiques pour les pathogènes du moins aux concentrations présentes chez les plantes vivantes (SAKUMA et coll. 1967).

La teneur en phénols seule ne peut expliquer la sensibilité ou la résistance ; les composés phénoliques peuvent même servir de source de carbone (LEE et coll. 1958). WAKIMOTO et coll. (1958) ont examiné l'action de l'acide chlorogénique sur la croissance de *Gloesporium kawakamii* ; ils ont trouvé que cet acide est utilisé par le champignon. La toxicité de ces composés diffère selon les parasites, par exemple l'acide chlorogénique n'est pas toxique pour certains

d'entre eux (CONDON et coll. 1960 ; SOKOLOVA, 1960 et 1966 et KUC, 1966) mais il l'est pour d'autres : LAWRENCE et coll. 1955; HAMPTON, 1962 et OZERET-SOKOVSKAYA et coll. 1968).

La toxicité dépend aussi du rapport entre les phénols et l'azote soluble (KIRKHAM, 1954). Une dose élevée d'N peut diminuer la résistance car les substances azotées jouent un rôle nutritionnel (FARKAS et coll. 1962).

Plusieurs auteurs ont montré que la toxicité de l'acide chlorogénique est en relation avec la dose utilisée : une action inhibitrice se manifeste à partir d'une dose assez élevée (1 314 μ M, WILSON et coll. 1971 ; 1 765 μ M, ECHANDI et coll., 1962 ; 2 827 μ M SOKOLOVA, 1966) par contre un effet stimulant se produit avec les doses faibles (110 μ M, ECHANDI et coll. 1962).

La structure chimique peut être un facteur important pour la toxicité de ces composés.

CHRISTIE (1965) a montré que la toxicité des composés phénoliques sur *Phytophthora cactorum* et *P. parasitica* est en relation avec leur structure chimique; les composés possédant un groupe OH en position ortho sont plus inhibiteurs que ceux dont le groupe OH est en position para ; la présence d'un groupe OH additionnel réduit l'effet toxique, par contre AKINREFON (1968) a rapporté que la fongitoxicité n'est pas en relation avec la structure chimique de ces composés.

L'oxydation enzymatique de l'acide chlorogénique produit une quinone toxique (JOHNSON et coll. 1952; RICH et coll. 1954). Certains micro-organismes sont résistants à la toxicité des phénols et des quinones ; ces organismes doivent avoir une polyphénoloxydase active qui oxyde et polymérise les phénols et les quinones et ainsi peut rendre ces composés inoffensifs pour l'organisme. (RICH et coll., 1954).

Pyrenochaeta lycopersici excrète une polyphénoloxydase (BESRI) capable d'oxyder nos substances phénoliques, car nous avons observé la coloration du milieu au cours de la culture. Il est possible que *P. lycopersici* soit résistant à la toxicité des produits d'oxydation.

Des travaux effectués sur l'acide gallique montrent des résultats différents ; ORELLANA et coll. (1965) ont constaté que cet acide favorise la croissance de *Botryotinia ricini* par contre WEBB (1970) a démontré que cette substance inhibe la croissance du mycélium de plusieurs champignons pathogènes du sol, particulièrement de certaines espèces de *Pythium* et de *Rhizoctonia*.

Selon LE TOURNEAU et coll. (1957 cité par DIEM, 1967), la faible toxicité de l'acide gallique est due à l'addition d'un groupement - COOH en position 5 du pyrogallol. Nos résultats ne montrent aucun effet en présence d'acide chlorogénique, par contre l'acide gallique a une action défavorable ; cette action augmente avec les doses les plus fortes.

C - Fraction cationique :

Les exsudats racinaires de Tomate ont levé la fongistase de *Verticillium albo-atrum*; le fractionnement de ces exsudats montre que l'effet stimulant est dû à la fraction cationique et que par conséquent les acides aminés sont responsables de la levée de la fongistase (LAWRENCE et GREEN, 1963).

RAI et coll. (1966) ont trouvé que la fraction cationique des exsudats racinaires de Betterave stimule la germination de zoospores d'*Aphanomyces cochlodes*.

Nos résultats montrent que la fraction cationique de la variété sensible a une action stimulante pour la germination des chlamydospores; par contre, celle de l'espèce résistante a un effet défavorable et par conséquent les acides aminés constituant cette fraction jouent un rôle important. En particulier, nos analyses montrent que la fraction cationique de la variété sensible est plus riche quantitativement et qualitativement que celle de l'espèce résistante. Nous pouvons proposer deux hypothèses pour l'action des acides aminés :

1. Un rôle quantitatif, car la quantité d'N totale dans cette fraction est 4 fois plus forte chez la variété sensible que chez l'espèce résistante.

COOK et SCHROTH (1965) ont montré que la germination des chlamydospores de *Fusarium solani* f. *phaseoli* dans le sol est limitée par les basses quantités d'N.

2. Un rôle qualitatif spécifique dû à un ou plusieurs acides aminés.

D - Effet des acides aminés :

Ecologiquement, une exigence nutritionnelle pour la germination des spores peut être un avantage en aidant à assurer que la germination ne se produira pas dans des environnements dépourvus des matériaux nécessaires à la croissance ultérieure (VINCENT, 1963).

Pour que les spores germent, elles ont besoin d'un facteur exogène actif pour synthétiser une substance nécessaire à la germination (SCHROTH et coll., 1961).

Nous avons montré que la germination commence 8 heures après l'incubation et même à ce moment on n'observe qu'une légère déformation des cellules. Cette période correspond au temps nécessaire à la synthèse d'un ensemble complet d'enzymes et conduit à l'hypothèse que la formation du tube germinatif est un processus endothermique dépendant de la présence de substrat et d'enzymes en concentration suffisante pour produire la quantité critique d'énergie nécessaire pour la transformation des cellules des spores en tube germinatif. Les champignons diffèrent naturellement par leurs mécanismes de production d'énergie et par l'efficacité de leurs systèmes enzymatiques. Beaucoup de recherches ont été effectuées sur le développement des champignons en présence des acides aminés ; on sait que des teneurs élevées en N augmentent la sensibilité aux parasites soit facultatifs soit obligatoires (PURKAYASTHA, 1971).

Nos analyses montrent une corrélation entre la sensibilité et la quantité d'N exsudée. Par contre, nous n'avons pas trouvé cette corrélation avec la croissance du mycélium. En effet, la concentration de certains types d'aliments n'est pas décisive ; le facteur important serait l'équilibre entre les différents produits : nous avons constaté qu'en augmentant le taux d'N chez *L. hirsutum*, à la même valeur que chez la variété Marmande, sans changer la balance entre les différents acides aminés, la production mycélienne reste toujours moins importante.

L'effet stimulant ou inhibiteur des acides aminés dépend de leur concentration et de la composition du milieu.

VAN ANDEL (1966) a démontré que la corrélation entre une grande concentration d'un acide aminé et la sensibilité ou entre une dose faible et la résistance est due à un effet stimulant ou à la nécessité de cet acide pour le développement du champignon.

Les relations complexes entre certaines variétés de Tomate et les différentes races de *Cladosporium fulvum* sont dues aux comportements différents de ces races en présence des acides aminés de ces variétés (VAN ANDEL, 1966). Plusieurs acides aminés sont essentiels à la croissance de certains micro-organismes ; on trouve souvent parmi eux l'acide glutamique (SKOROPAD et coll., 1957 ; MAINE et coll. 1961 ; KURTZ et coll. 1964 et PIQUEMAL et coll. 1971). Certains acides aminés occupent une place de premier plan dans la synthèse des autres et, de ce fait, peuvent jouer un rôle plus important dans la nutrition des organismes. L'acide glutamique qui a été identifié en grande concentration chez la variété sensible stimule le développement de *P. lycopersici*. Cette substance pourrait intervenir directement comme aliment nutritif nécessaire pour le parasite ; il est probablement le principal donneur de radicaux - NH₂ (VINCENT, 1963 et PIQUEMAL et coll. 1971) soit indirectement par la synthèse de proline et de glutamine, substances essentielles pour certains micro-organismes (SCHROTH et coll., 1963 et KRAFT, 1967).

Les deux hypothèses laissent donc entrevoir la possibilité d'expliquer l'action stimulante de l'acide glutamique.

Dans la littérature, il n'y a pas d'études intéressantes sur la citrulline. DIXON et coll. (1972) ont identifié cette substance dans la sève de la variété de Tomate sensible au *Verticillium albo-atrum* tandis qu'elle est absente chez la variété résistante.

Il existe sans doute un lien étroit entre l'effet de la citrulline et l'existence de celle-ci uniquement chez la variété Marmande et chez *L. peruvianum*.

CONCLUSION GENERALE

- Relations entre la sensibilité et l'effet des exsudats racinaires.

Trois espèces du genre *Lycopersicon* différentes dans leur sensibilité ou leur résistance vis-à-vis de *Pyrenochaeta lycopersici* ont été étudiées.

Dans le cas des agents pathogènes transmis par le sol comme *P. lycopersici*, l'interaction hôte-parasite commence avant l'infection au niveau de la rhizosphère notamment par l'intermédiaire des exsudats racinaires de l'hôte. Sous l'influence de ceux-ci, les organes de conservation de l'agent infectieux sont induits à germer. Le filament qui en est issu doit ensuite atteindre la surface de la racine et y développer des structures infectantes.

Dans le sol, pauvre en aliments et riche en germes, les exsudats racinaires sont la principale source de nutriments pour le parasite ; la littérature indique qu'ils présentent une certaine spécificité, en ce sens que les exsudats des plantes sensibles sont plus stimulantes que ceux des variétés résistantes.

Nous avons montré que c'était le cas pour *P. lycopersici* et que cette stimulation s'exerçait à la fois sur la germination et sur la croissance mycélienne.

L. peruvianum est particulièrement intéressant, comme l'avait déjà signalé BESRI (1970) ; sa résistance se perd avec l'âge. Le pourcentage de système racinaire attaqué passe de 3,6 chez des plantes de 21 jours à 28,9 chez des plantes de 50 jours. En même temps, les exsudats deviennent aussi stimu-

lants pour la germination des chlamydospores de *P. lycopersici* que ceux de la variété Marmande sensible. Mais il est bien évident que la résistance ne peut s'expliquer uniquement par cette action à distance. Les exsudats de *L. hirsutum* n'empêchent pas la germination et la croissance du parasite. Bien plus, les racines de l'espèce résistante sont infectées mais le taux de contamination ne dépasse pas 14% au stade 50 jours.

En outre, la plante réagit apparemment en empêchant la progression du parasite et peut-être même en l'éliminant. L'effet relativement défavorable des exsudats de plantes résistantes peut s'expliquer soit par la présence des composés toxiques et, tout naturellement, on pense aux composés aromatiques. Il peut aussi s'expliquer par la pauvreté ou l'absence de certains substrats favorisant le parasite.

- action des composés aromatiques :

Les exsudats de *L. hirsutum* diffèrent de ceux de Marmande par une plus grande richesse en acides chlorogénique et gallique. Nous avons montré que ceux-ci pris isolément ou en combinaison ont, à dose assez élevée, un effet inhibiteur faible.

En combinaison avec les acides aminés des exsudats de Tomate, ils ne diminuent pas significativement le taux de germination des chlamydospores. Leur action ne peut donc être exclue, d'autant plus qu'elle peut être modifiée en association avec d'autres composés aromatiques que nous n'avons pas étudiés.

En effet, la fraction cationique des exsudats a sensiblement la même action que ces derniers; tous deux donnent les mêmes taux de germination : 46% pour la variété Marmande et 30% pour *L. hirsutum*. Nous nous sommes surtout attachés à l'étude de cette fraction cationique.

- effet des acides aminés :

Les exsudats de la variété Marmande sont quatre fois plus riches en acides aminés

que ceux de *L. hirsutum*. De plus, au stade 50 jours, ceux de *L. peruvianum* deviennent plus riches que ceux de la variété sensible. Or la résistance partielle de cette espèce paraît due à un retard dans l'attaque de son système racinaire. Cependant, la richesse en N n'est pas seule en cause : des exsudats synthétiques de *L. hirsutum* concentrés quatre fois, donc contenant autant d' $N - NH_2$ que ceux de Marmande, sont moins favorables à la germination que ceux de *L. hirsutum*. Il faut donc envisager aussi un aspect qualitatif. L'acide glutamique est plus abondant chez la variété sensible qui fournit seule de la citrulline.

Nous avons montré que ces deux substances sont particulièrement favorables à la germination du parasite : associées à l'acide aspartique dont la teneur relative est semblable chez les deux espèces sensible et résistante, elles permettent un pourcentage de germination supérieur à 40%.

Pour pouvoir expliquer ces résultats, il faudrait connaître le métabolisme azoté de *P. lycopersici* mais on peut supposer que certaines séquences synthétiques sont peu actives et seraient compensées par l'acide glutamique ou la citrulline.

- relations entre les exsudats racinaires et la résistance :

L'effet des exsudats de trois espèces étudiées ne peut être la seule cause de la résistance ou de la sensibilité à la maladie. Cependant, une diminution relative de la germination des propagules ou de la croissance mycélienne sous l'action des exsudats racinaires équivaut à une baisse de la densité d'inoculum au niveau de la rhizosphère et permet à la plante d'échapper plus facilement à l'infection. De plus, on peut penser que des altérations métaboliques ont lieu chez le parasite sous l'action des exsudats sans que la germination des chlamydospores ou la croissance du mycélium soient affectées d'une façon spectaculaire. Ces altérations pourraient alors réduire dans une certaine mesure le pouvoir infectieux du parasite ou son aptitude à supporter les actions antagonistes des micro-organismes du sol. Il faut en effet rapprocher de nos résultats ceux obtenus par KHALIL (1973) : ils montrent que l'arginine et surtout l'asparagine diminuent le potentiel d'inoculum du sol dans le cas de *P. lycopersici*. Or l'asparagine stimule nettement la germination *in vitro* et en présence de sol

par levée de la fongistase. Mais dans ce deuxième cas, les tubes germinatifs sont rapidement lysés.

KHALIL (1973) n'a malheureusement pas étudié l'effet de l'acide glutamique mais on peut supposer qu'une alimentation plus favorable permettrait au parasite de mieux résister aux agressions des micro-organismes du sol. En effet, avec l'arginine, la lyse est plus limitée.

Notre travail souligne donc, s'il en était besoin, combien délicates sont les interactions entre l'hôte, le parasite et les saprophytes du sol. Il montre que la lutte biologique contre les agents pathogènes telluriques exige au préalable une connaissance approfondie de la physiologie des partenaires en présence. Il constitue ainsi une contribution fondamentale à la recherche de moyens efficaces dans la pratique.

B I B L I O G R A P H I E

- AGNIHOTRI V.P. and VAARTAJA O. (1967). -
Root exudates from red pine seedlings and their
effects on *Pythium ultimum*.
Can. J. Bot., 45 : 1031-1040.
- AGNIHOTRI V.P. and VAARTAJA O. (1968). -
Seed exudates from *Pinus resinosa* and their effects
on growth and zoospores germination of *Pythium*
afertile.
Can. J. Bot., 46 : 1135-1141.
- AKINREFON O.A. (1968). -
Phenolic fungitoxicity and the possible rol of pheno-
lase of *Phytophthora plamivora*.
Phytopath. Z., 63 : 153-164.
- BARTON R. (1957). -
Germination of oospores of *Pythium mamillatum* in
response to exudates living seedlings.
Nature, 180 : 613-614.
- BESRI M. (1970). -
Recherches concernant l'écologie, la morphologie
et la physiologie de l'agent du "Corky-root".
Thèse Doct. Ing. Fac. Sci. Nancy, 138 P.
- BOARDMAN N.K. (1962). -
Ion-exchange chromatography.
Modern methods of plant analysis, Vol. 5 : 159-204.
- BOOTH J.A. (1969). -
Gossypium hirsutum tolerance to *Verticillium albo-*
atrum infection. I. Amino acid exudation from
aseptique roots of tolerant and susceptible cotton.
Phytopathology, 59 : 43-46.

- BUSHAN L.J. and SURYANARAYANA D. (1971). -
Shift in carbohydrate spectrum of root exudation
of wheat in relation to its roots disease.
Plant and soil, 34 : 261-267.
- BUXTON E.W. (1957). -
Some effects of pea root exudates on physiological races of *Fusarium oxysporum*.
Trans. Brit. Myco. Soc. 40 : 145-154.
- BUXTON E.W. (1958). -
A change of pathogenic race in *Fusarium oxysporum*
f. *pisi* induced by root exudate from a resistant
host.
Nature, 181 : 1222-1224.
- BUXTON E.W. (1960). -
Effects of pea root exudate on the antagonism of
some rhizosphere microorganisms towards *Fusarium*
oxysporum f. *pisi*.
J. gen. Microbiol. 22 : 678-689.
- BUXTON E.W. (1962). -
Root exudates from banana and their relationship
to strains of the *Fusarium* causing Panama wilt.
Ann. appl. Biol. 50 : 269-282.
- CAPRILES DE REYES J., SCHULZ B.E. and coll. (1966). -
Chlorogenic acid content of different cacao
varieties and its relation to resistance
Ceratocystis fimbriata.
Agron. trop. Venezuela 16 (4) : 273-284.
- CHRISTIE T. (1965). -
The effect of some phenolic compounds upon the
growth of two species of *Phytophthora*.
New Zealand J. Agr. res. 8 (3) : 630-635.
- CLARK R.S., KUC' J., HENZE R.E. and coll. (1959). -
The nature and fungitoxicity of an amino acid
addition product of chlorogenic acid.
Phytopathology, 49 : 594-598.
- COLEY-SMITH J.R. and HICKMAN C.J. (1957). -
Stimulation of sclerotium germination of
Sclerotium cepivorum Berk.
Nature, 180 : 445

- CONDON P. and KUC' J. (1960). -
Isolation of a fungitoxic compound from carrot
root tissue inoculated with *Ceratocystis fimbriata*.
Phytopath. 50 : 267-270.
- COOK R.J. and SCHROTH M.N. (1965). -
Carbon and nitrogen compounds and germination
of chlamydospores of *Fusarium solani* f. *phaseoli*.
Phytopathology, 55 : 254-256.
- COOKE I.J. (1962). -
Damage to plant roots caused by urea and
anhydrous ammonia.
Nature 194 : 1262-1263.
- DELON R. (1972). -
Etude structurale et ultrastructurale de *Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Marmande parasité par *Pyrenochaeta lycopersici* Gerlach et Schneider.
Thèse de spécialité, Univ. Nancy I, U.E.R. P.C.B.
82 P.
- DIEM H.G. (1967). -
Influence de quelques polyphénols sur la croissance et la sporulation de *Phytophthora cryptogea* Pethyb. et Laff.
Bull. Ecol. Nat. Sup. Agr. Nancy, 9.1 : 29-34.
- DIXON G.R. and PEGG G.F. (1972). -
Changes in amino acid content of Tomato xylem sap following infection with strains of *Verticillium albo-atrum*.
Ann. Bot. 36 : 147-154.
- DJAVADI F.H.S. (1968). -
Composition de la mycoflore des semences et *Verticillium* du Cotonnier.
Thèse Doct. Ing. Fac. Sci. Nancy, 129 P.
- DJAVADI F. et MANGENOT F. (1968). -
Influence des exsudats radicellaires des plantes de Cotonnier sensible, tolérant et résistant sur certains aspects du métabolisme du *Verticillium dahliae* Kleb.
C.R. Acad. Sci. Paris, T. 267 : 309-312.

- DOMMERGUES Y. et MANGENOT F. (1970). -
Ecologie microbienne du sol.
Masson & Cie, Paris, 796 P.
- EBBEN M.H. and WILLIAMS P.H. (1956). -
Brown root rot of Tomato. The associated fungal
flora.
Ann. app. Biol., 44 (3) : 425-436.
- ECHANDI E. and FERNANDEZ (1962). -
Relation between chlorogenic content and resistance
to coffee canker incited by *Ceratocystis fimbriata*.
Phytopathology, 52 : 544-546.
- EL NAGHY M.A., MOUBASHER A.H. and MEGALA S.E. (1971). -
Stimulation of sclerotial germination of *Sclerotium
cepivorum* by host plant extract.
Plant and Soil, 34 : 109-119.
- EL OUCH Z. (1971). -
Etude par chromatographie sur couche mince des
exsudats radicellaires non stériles de plantules
de Tomates sensibles et résistantes au *Pyrenochaeta
lycopersici*.
D.E.A Biol. vég. Univ. Nancy I, U.E.R. P.C.B.
- FARKAS G.L. and KIRALY Z. (1962). -
Role of phenolic compounds in the physiology of
plant disease resistance.
Phytopath. Z., 105-150.
- GUENZI W.D. and Mc CALLA T.A. (1966). -
Phenolic acids in Oats, Wheat, Sorghum and Corn
residues and their phytotoxicity.
Agron. J., 58 : 303-304.
- HAMPTON R.E. (1962). -
Changes in phenolic compounds in carrot root tissue
infected with *Thielaviopsis basicola*.
Phytopathology, 52 : 413-415.
- HARLEY J.L. (1959). -
The biology of mycorrhiza.
LEONARD HILL, London: 233 P.

- HARRANGER M.-F. (1973). -
Etude ultrastructurale des interactions de *Lycopersicon hirsutum* et de *Pyrenochaeta lycopersici*.
D.E.A. Biologie végétale Univ. Nancy I, 51 P.
- HUSAIN S.S. and Mc KEEN W.E. (1963). -
Interactions between strawberry roots and *Rhizoctonia fragariae*.
Phytopathology, 53 : 541-545.
- JACKSON R.M. (1957). -
Fongistasis as a factor in the rhizosphere phenomenon.
Nature, 180 : 96-97.
- JOHNSON G. and SCHAAL L.A. (1952). -
Relation of chlorogenic acid to scab-resistance in potatoes.
Science, 115 : 627-629.
- JOHNSON G. and SCHAAL L.A. (1957). -
Chlorogenic acid and other orthodihydrique phenols in scab-resistant (Russet Burbank) and scab-susceptible (Triumph) potato tubers of different maturities.
Phytopathology, 47 : 253-255.
- KATZNELSON H., ROUATT J.W. and coll. (1954). -
Liberation of amino acids by plant root in relation to disiccation.
Nature, 174 : 1110-1111.
- KHALIL M. (1971). -
Effet des exsudats radicellaires de différentes espèces de Tomate sur la germination de *Pyrenochaeta lycopersici* (agent du "Corky root"), potentiel infectieux du sol.
D.E.A. Biol. vég. Univ. Nancy I, U.E.R. P.C.B.
- KHALIL M. (1973). -
Influence de quelques sources de carbone et d'azote sur la germination de *Pyrenochaeta lycopersici* et son potentiel infectieux.
Thèse de Spécialité, Univ. Nancy I, U.E.R. P.C.B. 57 P.
- KIRKHAM D.S. (1954). -
Significance of the ration between the water-soluble aromatic and nitrogen constituents of apple and pear in the host-parasite relationships of *Venturia* species.
Nature, 173 : 690-691.

- KOVACS M.F. (1971). -
Identification of aliphatic and aromatic acids in
root and seed exudates of peas, cotton and barley.
Plant and Soil, 34 : 441-451.
- KRAFT J.M. and ERWIN D.C. (1967). -
Effects of nitrogen sources on growth of *Pythium*
aphanidermatum and *P. ultimum*.
Phytopathology, 57 : 374-376.
- KRAFT J.M. and ERWIN D.C. (1967). -
Stimulation of *Pythium aphanidermatum* by exudates
from Mung bean seeds.
Phytopathology, 57 : 866-868.
- KRAFT J.M. and ROBERTS D.D. (1970). -
Resistance in peas to *Fusarium* and *Pythium* root
rot.
Phytopathology, 60 : 1814-1817.
- KUC' J., HENZE R.E. and coll. (1956). -
Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic
produced by potatoes in response to inoculation
with *Helminthosporium carbonum*.
J. am. Chem. Soc., 78 : 3123-3125.
- KUC' J. (1957). -
Biochemical study of the resistance of potato
tuber tissue to attack by various fungi.
Phytopathology, 47 : 676-680.
- KUC' J. (1966). -
Resistance of plants to infection agents.
Ann. Rev. Microbiol., 20 : 337-370.
- KURTZ E.B. and FERGUS C.L. (1964). -
Nitrogen nutrition of *Colletotrichum coccodes*.
Phytopathology, 54 : 691-692.
- LAST F.T. and EBBEN M.H. (1966). -
The epidemiology of tomato brown root rot.
Ann. Appl. Biol., 57 : 95-112.

- LAST F.T. and EBBEN M.H. and HOARE R.C. (1969). -
Build up of tomato brown root rot caused by
Pyrenochaeta lycopersici.
Ann. Appl. Biol., 64 (3) : 449-459.
- LAWRENCE A.S., JOHNSON G. and coll. (1953). -
Comparison of scab-resistance of potato tubers
as indicated by the ferric chloride test.
Ann. Potato J., 30 : 557-562.
- LAWRENCE A.S. and JOHNSON G. (1955). -
Inhibitory effect of phenolic compounds on the
growth of *Streptomyces scabies* as related to
the mechanism of scab-resistance.
Phytopathology, 45 : 626-628.
- LAWRENCE A.S. and GREEN R.J. (1963). -
Effect of root exudates on germination of conidia
and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*
inhibited by the soil fungistatic principal.
Phytopathology, 53 : 260-264.
- LEDERER E. (1959 et 1960). -
Chromatographie en chimie organique et biologie.
Vol. I et II - Ed. Masson et Cie, Paris.
- LEE S.F. and LE TOUREAU D. (1958). -
Chlorogenic acid content and *Verticillium* wilt
resistance of potatoes.
Phytopathology, 48 : 268-274.
- LOUVET J. (1971). -
Les maladies des plantes. Modes de développement et
méthodes de lutte.
I.N.R.A. Publ., 71. 1. Paris, 236 P.
- LYNN L.S. and DOMSCH K.H. (1970). -
Amino acids in exudates of healthy and fungus-
affected pea roots.
Arch. Microbiol., 70 : 240-242.
- MACURA J. (1971). -
Some biological and ecological aspects of the rhi-
zosphere effect.
Folia microbiol. Techecosk. 16(4) : 328-336.

- MAINE E.C. and KELMAN (1961). -
The influence of reducing substances on resistance
to bacterial wilt in tobacco.
Phytopathology, 51 : 491-492.
- Mc LEAN J.G., DUANE J. and coll. (1961). -
Relation of histochemical tests for phenols to
Verticillium wilt resistance of potatoes.
Phytopathology, 51 : 84-89.
- MENDEZ J. and BROWN S.A. (1971). -
Phenols and coumarins of tomato plants.
Can. J. Bot., 49 : 2097-2100.
- MENDEZ J. and BROWN S.A. (1968). -
Effects of nitrogenous materials on translocation
and stump exudation system of tomato.
Can. J. Bot., 46 : 363-376.
- MOHADDES M. (1971). -
Action des excrétiions racinaires de cinq espèces
végétales sur *Azotobacter chroococcum*.
Thèse Doct. Ing. Fac. Sci., Paris, 90 P.
- NEAL J.L., LU K.C. and coll. (1968). -
A comparison of rhizosphere microfloras associated
with mycorrhizae of red alder and douglas-fir.
Biol. of alder-portland, Oregon Forest Service
U.S. Department of Agriculture, 291 P.
- NORDMANN R., GAUCHERY O. and coll. (1954). -
Chromatographie sur papier des acides organiques
non volatils des liquides biologiques. Technique
chromatographie.
Bull. Soc. Chim. Biol., 36 : 1461-1471.
- NOUREL-DIN M.S. and SHARKAS M.S. (1964). -
The pathogenecity of *Rhizoctonia solani* in relation
to different tomato root exudates.
Phytopath. Z., 51 : 285-290.
- ORELLANA R.G. nad THOMAS C.A. (1965). -
Effect of gallic acid on germination, growth and
sporulation of *Botryotinia ricini*.
Phytopathology, 55 : 468-470.

- OZERET S.O.L., VASYUKOVA N.I. and coll. (1968). -
Antibiotic substance from potato tubers.
Chem. Abst. 65208, P. 1969.
- PAQUIN R. (1968). -
Détermination des acides organiques et des acides aminés chez quelques variétés européennes de pommes de terre résistantes et susceptibles au flétrissement bactérien.
Eur. Potato J. II: 157-164.
- PARK D. (1963). -
The ecology of soil borne fungal disease.
Ann. rev. phytopathology, 241-258.
- PARKINSON D. (1955). -
Liberation of amino-acids by oate seedlings.
Nature, 176 : 35-36.
- PATIL S.S., ZUCKER M. and DIMOND A.E. (1966). -
Biosynthesis of chlorogenic acid in potato roots resistant and susceptible to *Verticillium albo-atrum*.
Phytopathology, 56 (8) : 971-974.
- PI C. L. and ROHDE (1967). -
Phenolic compounds and host reactions in tomato to injury caused by root knot and lesion nematodes.
Phytopathology, 57 : 344 (Abstr.).
- PIQUEMAL M., LATCHE J.C. et coll. (1971). -
Quelques aspects de l'utilisation de l'acide glutamique par le mycélium d'*Agaricus bisporus*.lge.
C.R. Acad. Sci., Paris, t. 272 : 52-55.
- PURKAYASTHA R.P. (1971). -
Resistance of crop plants to fungal diseases.
Science and culture, 37 : 319-328.
- RAI P.V. and STROBEL G.A. (1966). -
Chemotaxis of zoospores of *Aphanomyces cochliods* to sugar beet seedling.
Phytopathology, 56 : 1365-1369.

- RANDERATH K. (1965). -
Dunnschicht Chromatographie.
Verlag Chemie, GMBH Weinheim/Bergstr.
- REDINGTON C.B. and PETERSON J.L. (1971). -
Influence of environment on *Albizzia julibrissin*
root exudation and exudate effect on *Fusarium*
oxysporum f. sp. *perniciosum* in soil.
Phytopathology, 61 : 812-815.
- RICH S. and HORSFALL J.G. (1954). -
Relation of polyphenoloxidases to fungitoxicity.
Parc. Natl. Acad. Sci. U.S. (40) : 139-145.
- ROVIRA A.D. (1956). -
Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudates from oats and peas.
Plant and soil, Vol. 7 (2) : 178-194.
- ROVIRA A.D. (1959). -
Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exudation.
Plant and soil, 11 : 53-54.
- ROVIRA A.D. (1962). -
Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora.
Soil and fertilizers, 25 (3) : 167-172.
- ROVIRA A.D. (1965). -
Plant root exudation and their influence upon soil micro-organismes.
Ecology of soil borne plants pathogens Ed. K.F. BAKER et coll. Un. California presse.
- ROVIRA A.D. (1969). -
Plant root exudates.
Bot. Rev., 35 (1) : 35-37.
- SAKUMA T. and TOMIYAMA K. (1967). -
The role of phenolic compounds in the resistance of potato tuber tissue to infection by *Phytophthora infestans*.
Ann. Phyto. Soc. Japan, 33 : 48-58.

SCHROTH M.N. and SNYDER W.C. (1961). -
Effect of host exudates on chlamydospores
germination of the bean root rot fungus,
Fusarium solani f. *phaseoli*.

Phytopathology, 51 : 389-393.

SCHROTH M.N., TOUSSOUN T.A. and SNYDER W.C. (1963). -
Effect of certain constituents of bean exu-
date on germination of chlamydospores of
Fusarium solani f. *phaseoli* in soil.

Phytopathology, 53: 809-812.

SHU-FUNG L. and LE TOURNEAU D. (1958). -
Chlorogenic acid content and *Verticillium*
wilt resistance of potatoes.

Phytopathology, 48 : 268-274.

SINGH R.S. (1964). -
Development of *Pythium ultimum* in soil in
relation to presence and germination of seed
of different corps.

Mycopath. Mycol. App., 27 : 155-160.

SKOROPAD W.P. and ARNY D.C. (1957). -
The influence of amino- acids on the growth
of two strains of *Helminthosporium gramineum*.

Phytopathology, 47 : 249-252.

SLANKIS V., RONECKLES V.C. and KROTKOV G. (1964). -
Metabolites liberated by roots of *Pinus stro-*
bis seedlings.

Physiologia plantarum, 17.

SOKOLOVA V.E., ISAVEL'EVA O.N. and coll. (1960). -
Toxicity of chlorogenic acid towards the
mold *Phytophthora infestans*.

Compt. rend. Sci. URSS, 131 : 968-971.

SOKOLOVA V.E. (1966). -
Role of some phenols for studing protective
reactions of plant.

Chem. abst. 65376, W. 1968.

- STIVEN G. (1952). -
Production of antibiotic substances by the roots of a grass.
Nature, 170 : 712-713.
- SULOCHANA C.B. (1962). -
Amino acids in root exudates of cotton.
Plant and soil, 3 : 312-326.
- TERMOHLEN G.P. (1962). -
Onderzoekingen over Kurkwortel van Tomaat en over de Kurkortschimmel.
T. Pl. Ziekten, 68 : 295-367.
- THIND B.S. and CHAND J.N. (1968). -
Studies on physiology of *Helminthosporium australiense*. The causal agent of leaf spot disease of Bajra.
Indian Phytopathology, 190-195.
- TURNER P.D. (1963). -
Influence of root exudates of cacao and other plants on spore development of *Phytophthora palmivora*.
Phytopathology, 53 : 1337-1339.
- ULJEE A.H. (1964). -
Ammonium nitrogen accumulation and root injury to tomato plants.
N.Z.Jl. Agr. Res., 7 : 343.
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H. and coll. (1959). -
Manometric techniques.
Burgess publ. Co., 338 P.
- VAN ANDEL O.M. (1966). -
Amino acids and plant diseases.
Ann. rev. phytopathology, 4 : 349-368.
- VANČURA V. (1964). -
Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth.
Plant and soil, 21 : 231-248.

- VANČURA V. and HOVADIK A. (1965). -
 Root exudates of plants. II. Composition of
 root exudates of some vegetable (tomato, red
 pepper, cucumber, turnip and cabbage).
 Plant and soil, 22 : 21-32.
- VANČURA V. (1967). -
 Root exudates of plants. III. Effect of tempe-
 rature and "cold shock" on the exudation of
 various compounds from seed and seedlings of
 maize and cucumber.
 Plant and soil, 17 (3) : 319-328.
- VANČURA V. and GARCIA J.L. (1969). -
 Root exudates of reversibly wilted Millet plants.
 Oecol. Plant., Gauthier-Villars IV : 93-98.
- VANČURA V., STANEK M. and HANZLIKOVA A. (1969). -
 Effect of seed and root exudates on the growth
 of Xanthomonas phaseoli var. fuscans.
 Fol. microbio., 14 : 23-26.
- VANEGERAAT A.W.S.M. (1971). -
 Root exudates and growth of Rhizopium.
 Antome van leeuwenhoek, 37 : 260-261.
- VINCENT W.C. (1963). -
 Physiology of fungi.
 New York, John Wiley and sons, Inc. : 524 P.
- WAGGONER P.E. and DIMOND D.E. (1956). -
 Polyphenoloxidases and substrats in potato and
 tomato stems.
 Phytopathology, 46 : 495-497.
- WAKIMOTO S., IKARI H. and coll. (1959). -
 Relation between polyphenols contained in plants
 and phytopathogenic fungi. II. On some polyphenols
 from the paulwonia-tree and their additive effect
 on the growth of the pathogenic fungus *Gloeosporium*
kawakamii in culture.
 Ann. Phyto. Soc. Japan II et III : 195-206.

WEBB D.P. (1970). -

Presence of fungal inhibitor in the pericarps
of *Acer saccharum* fruits.

Can. J. Bot., 48 : 2109-2116.

WILSON K.I. and SRIVASTAVA D.N. (1971). -

Studies on the nature of red rot resistance
in sugar can II. Effect of chlorogenic acid
on the spore germination of *Colletotrichum*
falactum.

Phytopath. Z., 71 : 29-32.

YOUSSEF Y.A. and MANKARIOS A.T. (1969). -

Studies on the rhizosphere mycoflora of broad
bean and cotton. II Seed and root exudates
and their effects on spore germination and
growth of the prevalent fungi isolated from
the rhizosphere.

Mycol. appl. Pays-Bas, 38 (3) : 257-269.

YUNG-CHANG-HO (1970). -

The effect of root exudates on the germination
of *Pythium aphanidermatum* zoosporecysts.

Can. J. Bot. 48 : 1501-1514.

NOM DE L'ETUDIANT : EL OUCH Zarif

NATURE DE LA THESE : DOCTEUR INGENIEUR

VU, APPROUVE

& PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 11 juin 1974

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



